

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Livia Hamaček

PROMJENE U ULTRASTRUKTURI I PROTEOMU STANICA KORIJENA LUKA
(*Allium cepa* L.) POD UTJECAJEM NANOČESTICA I IONA SREBRA

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju i Laboratoriju za biljnu proteomiku na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić te u Laboratoriju Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković, voditelja doc. dr. sc. Maria Cindrića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na ukazanom strpljenju, pruženoj pomoći, danim savjetima te uloženom velikom trudu kako kroz eksperimentalni dio istraživanja tako i tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Mariu Cindriću na gostoprimstvu i pomoći oko analize i identifikacije proteina.

Zahvaljujem se kolegama/icama u laboratoriju koji su mi upotpunili vrijeme provedeno u njemu.

Zahvaljujem se svojim prijateljima/icama koji su sa mnom prolazili kroz sve radosti i tuge ovog studentskog razdoblja.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji bez čije podrške ne bih bila tu gdje jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PROMJENE U ULTRASTRUKTURI I PROTEOMU STANICA KORIJENA LUKA (*Allium cepa* L.) POD UTJECajem NANOČESTICA I IONA SREBRA

Livia Hamaček

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) proizvode se brzo i u velikim količinama zbog iznimnih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava koja povećavaju učinkovitost protumikrobnog djelovanja srebra. Međutim, radi svoje velike površine u odnosu na volumen, AgNP su vrlo reaktivne i podložne otpuštanju iona srebra (Ag^+) što potencijalno povećava njihovu toksičnost. U ovom diplomskom radu proučen je utjecaj AgNP stabiliziranih različitim omotačima (citrati, CTAB, PVP) i utjecaj ionskog srebra (AgNO_3) na morfologiju stanica i ekspresiju ukupnih topljivih proteina korijena luka (*Allium cepa* L.). U provedenom istraživanju nisu uočene značajne morfološke promjene u ultrastrukturi stanica, ali je primijećen ulazak i akumulacija AgNP u njima. Dvodimenzionalnom elektroforezom analizirane su promjene u proteinskim profilima različito tretiranih korijena luka, a spektrometrijom masa identificirani su proteini drugačijeg stupnja ekspresije. Ustanovljeno je kako su oba oblika srebra uzrokovala različite promjene u proteinskoj slici korijena luka i to povećanu ekspresiju proteina koji sudjeluju u metabolizmu ugljika, mehanizmima obrane od stresa, biljnom rastu i razvoju, procesima vezanima za hormone rasta, staničnom disanju i regulaciji transkripcije te smanjenu ekspresiju proteina uključenih u transport, zarazu i obranu, sintezu proteina i stabilnost kromosoma. Rezultati su pokazali da ionsko srebro i AgNP stabilizirane trima različitim organskim omotačima međusobno različito djeluju na veličinu/debljinu korijena i da prvenstveno utječu na povećanu ekspresiju proteina u korijenu luka.

(100 stranica, 15 slika, 20 tablica, 142 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: nanočestice srebra, luk, *Allium cepa*, transmisivna elektronska mikroskopija, 2-D elektroforeza, spektrometrija masa

Voditelj: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Vesna Petrović-Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 01.09.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

CHANGES IN ULTRASTRUCTURE AND PROTEOME OF ONION (*Allium cepa* L.) ROOT CELLS EXPOSED TO SILVER NANOPARTICLES AND IONS

Livia Hamaček

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Silver nanoparticles (AgNPs) are being manufactured quickly and in large quantities due to their exceptional physical, chemical and biological properties that increase the efficiency of antimicrobial action of silver. However, because of their large surface area to volume ratio, AgNPs are highly reactive and subjected to silver ions (Ag^+) release which potentially increases their toxicity. In this graduation thesis the impact of AgNPs stabilized with different coatings (citrate, CTAB, PVP) and the impact of AgNO_3 on onion root morphology and the expression of total soluble proteins were examined. Significant morphological changes in the ultrastructure of onion root cells were not observed in this research, but it was found that AgNPs entered those cells and accumulated in them. Changes in protein profiles of differently treated onion roots were analyzed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry was used to identify proteins with different expressions. It was found that both forms of silver caused different changes in protein profile of root cells; they increased expression of proteins included in carbohydrate metabolism, plant mechanisms against stress, plant growth and development, processes associated with growth hormones, cellular respiration and regulation of transcription and decreased expression of proteins that play a role in transport, defence, protein synthesis and chromosome stability. The results showed that silver ions and AgNPs stabilized with three different organic coatings have mutually different effects on root size/thickness and primarily cause the increased expression of the proteins in onion root cells.

(100 pages, 15 figures, 20 tables, 142 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: silver nanoparticles, onion, *Allium cepa*, transmission electron microscopy, 2-D electrophoresis, mass spectrometry

Supervisor: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. prof.

Thesis accepted: 01.09.2016.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA	akrilamid
AgNP	nanočestice srebra
APS	amonijev peroksodisulfat
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
BSA	serumski goveđi albumin
CAF	kemijski potpomognuta fragmentacija
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CHCA	α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
2-DE	dvodimenzionalna elektroforeza
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EtOH	etanol
IAA	jodoacetamid
IPG	imobilizirani pH gradijent
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MS	spektrometrija masa
MS /MS	tandemska spektrometrija masa
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVP	polivinilpirolidon
reH ₂ O	redestilirana voda
SDS	natrijev dodecil sulfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletetilendiamin
TFA	trifluoroctena kiselina
TOF	vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nanomaterijali	2
1.1.1. Nanočestice srebra (AgNP)	3
1.2. Luk (<i>Allium cepa</i>) kao modelni organizam	4
1.3. Svjetlosna i transmisijska elektronska mikroskopija	5
1.4. Proteomika	6
1.4.1. Jednodimenzionalna elektroforeza; SDS-PAGE	7
1.4.2. Dvodimenzionalna elektroforeza	7
1.4.3. Spektrometrija masa	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijal	14
3.1.1. Nanočestice srebra	14
3.1.2. Biljni materijal	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Svjetlosna i elektronska mikroskopija	15
3.2.1.1. Priprema uzoraka za svjetlosnu mikroskopiju	15
3.2.1.2. Priprema uzoraka za transmisijsku elektronsku mikroskopiju	16
3.2.2. Fenolna ekstrakcija ukupnih topivih proteina	17
3.2.2.1. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima za jednodimenzionalnu i dvodimenzionalnu elektroforezu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)	20
3.2.3. Analiza proteina	21
3.2.3.1. Razdvajanje proteina jednodimenzionalnom SDS-PAGE (1-DE)	21
3.2.3.2. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom SDS-PAGE (2-DE)	23

3.2.3.2.1. Rehidracija imobilina	23
3.2.3.2.2. Izoelektrično fokusiranje – prva dimenzija.....	24
3.2.3.2.3. Ekvilibracija imobilina.....	24
3.2.3.2.4. SDS-PAG elektroforeza – druga dimenzija	25
3.2.3.3. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom Coomassie Brilliant Blue.....	26
3.2.3.4. Snimanje i analiza gelova	26
3.2.3.5. Analiza proteina spektrometrijom masa	27
3.2.3.5.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu	27
3.2.3.5.2. Digestija proteina u gelu.....	27
3.2.3.5.3. Ekstrakcija peptida iz gela.....	28
3.2.3.5.4. Derivatizacija peptida uz kemijski potpomognutu fragmentaciju.....	29
3.2.3.5.5. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C ₄	29
3.2.3.5.6. Analiza peptida spektrometrom masa	30
3.2.3.5.7. Obrada podataka – identifikacija homolognih proteina	31
4. REZULTATI.....	35
4.1. Morfologija i ultrastruktura	36
4.1.1. Nanočestice srebra i njihovi omotači.....	36
4.1.2. Strukturne promjene u tkivu korijena luka utvrđene svjetlosnim mikroskopom	37
4.1.3. Strukturne promjene u tkivu korijena luka utvrđene elektronskim mikroskopom	41
4.2. Razdvajanje, vizualizacija i identifikacija proteina.....	42
4.2.1. 1D-profil ukupnih topivih proteina u tkivu korijena luka	43
4.2.2. 2D- profil i razlikovna ekspresija ukupnih topivih proteina u tkivu korijena luka	44
4.2.3. Identifikacija proteina spektrometrijom masa.....	51
5. RASPRAVA.....	69
5.1. Morfološke i ultrastrukturne promjene	70
5.2. Promjene u proteomskoj slici.....	73

5.2.1. Proteini uključeni u odgovor na stres	73
5.2.2. Proteini uključeni u sintezu proteina	75
5.2.3. Proteini uključeni u stresom inducirane promjene u metabolomu stanice	75
5.2.3.1. Proteini uključeni u metabolizam ugljika	75
5.2.3.2. Proteini uključeni u metabolizam dušika	77
5.2.4. Proteini uključeni u proces zaraze i obrane	78
5.2.5. Proteini uključeni u biljni rast i razvoj te hormoni rasta	79
5.2.6. Proteini uključeni u staničnom disanju	79
5.2.7. Proteini uključeni u regulaciji transkripcije	80
5.2.8. Proteini uključeni u procese transporta i prijenosa signala.....	80
5.2.9. Proteini uključeni u regulaciju stanične proliferacije.....	81
5.2.10. Proteini odgovorni za stabilnost kromosoma	81
5.2.11. Proteini koji sudjeluju u izgradnji stanične strukture.....	82
5.2.12. Proteini uključeni u procesiranje RNA	82
6. ZAKLJUČAK.....	85
7. LITERATURA.....	87
ŽIVOTOPIS.....	100

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali

Nanotehnologija je primijenjena grana znanosti koja se bavi istraživanjem specifičnih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava materijala čija je veličina izražena na nanometarskoj skali te stvaranjem funkcionalnih uređaja i sustava sastavljenih od takvih nanomaterijala. Prefiks nano označava faktor 10^{-9} , obuhvaća dimenzije između 0,1 nm i 100 nm, a osim na veličinu (nanometar), može se odnositi i na vrijeme (nanosekunda), volumen (nanolitar) i masu (nanogram). Prema broju dimenzija izraženih na nano razini, nanomaterijale se može podijeliti u tri podskupine: nanostrukturirane površine, kojima je samo jedna dimenzija (debljina) između 1 nm i 100 nm, nanocjevčice koje imaju promjer izražen na nanoskali te nanočestice, trodimenzijske nanoobjekte, sa svakom prostornom dimenzijom izraženom na nanometarskoj razini (Sekhon, 2014).

Prema najnovijim podacima (Nanotechnology Products Database) na svjetskom se tržištu trenutno nalazi 5074 proizvoda koji sadrže nanomaterijale. Do danas provedena istraživanja u području nanoznanosti rezultirala su primjenom nanostrukturiranih materijala ne samo u znanstvenoj djelatnosti, nego i u mnogim proizvodima koje čovjek svakodnevno koristi. Zahvaljujući svojim jedinstvenim električnim, kemijskim i fizikalnim svojstvima nanomaterijali se sve više koriste u medicini, prehrambenoj, kozmetičkoj, tekstilnoj i elektroničkoj industriji, proizvodnji energije i remedijaciji okoliša. Takvi materijali najčešće sadrže nanočestice srebra, titanijeva ili silicijeva dioksida, cinkova oksida te ugljika (Ivanković, 2011; Vannini i sur., 2013).

Kako se upotreba nanomaterijala posljednjih godina osobito širi, nameće se pitanje o tome koje rizike, uz veliki tržišni potencijal, nanomaterijali sa sobom donose. Zadnjih godina raste broj istraživanja o mogućim negativnim utjecajima nanostrukture na žive organizme, ali je mali broj radova o utjecaju nanočestica u biljnim stanicama. Utjecaj na biljke osobito je važan jer su one neizostavna komponenta svakog ekosustava. Biljne vrste u sebi bioakumuliraju nanostrukturirane materijale zbog čega imaju ključnu ulogu u njihovom prijenosu u okoliš (Monica i Cremonini, 2009). Rezultati dosadašnjih istraživanja genotoksičnih i citotoksičnih učinaka nanomaterijala na biljke ukazuju na različite pozitivne i negativne utjecaje. Primjerice, dokazan je pozitivan učinak nanočestica silicijeva

i titanijeva dioksida na aktivnost enzima nitrat reduktaze u soji što ubrzava njeno klijanje i rast (Lu i sur., 2002), a negativni utjecaj otkriven je u rajčici u kojoj nanočestice srebra inhibiraju rast njenih korijena (Song i sur., 2013). Mala veličina nanočestica u odnosu na veliku površinu uzrokuju njihova jedinstvena svojstva i čine ih osobito reaktivnima (Lanje i sur., 2010). Iste zbog toga pokazuju citotoksičan učinak uslijed sposobnosti da potiču nastanak reaktivnih oblika kisika i uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa (Nowack i sur., 2007). Pored proizvoda koji sadrže nanomaterijale, moguću opasnost za živi svijet predstavljaju i pogoni u kojima se isti proizvode, a koji nanomaterijale ispuštaju u zrak, vodu i tlo i tako ugrožavaju biljni i životinjski svijet, a posredno i čovjeka koji konzumira hranu u kojoj je došlo do akumulacije tih materijala (Nowack i sur., 2007).

1.1.1. Nanočestice srebra (AgNP)

Srebro se kao antibakterijsko sredstvo u prošlosti koristilo za zacijeljivanje rana, smanjenje postoperativnih infekcija, liječenje akna, itd. Mogućnošću sintetiziranja nanosrebra, tj. transformacije srebra u nanočestice, njegova je djelotvornost povećana tisuću puta pa nanočestice srebra (AgNP) danas imaju posebno mjesto unutar interesne sfere mnogih industrija upravo zbog svojih antibakterijskih i antimikrobnih svojstava (Sondi i Salopek-Sondi, 2004). Mogu se naći u medicinskim uređajima i proizvodima, pakiranjima hrane, proizvodima tekstilne industrije, proizvodima za kućanstvo, pesticidima, spektralno selektivnim premazima za apsorpciju solarne energije te kao katalizatori u kemijskim reakcijama (Choi i sur., 2008; Prabhu i Poulouse, 2012; Nurani i sur., 2015).

Međutim, karakteristike koje AgNP čine korisnima čovjeku istovremeno dovode do zabrinutosti da mogu predstavljati rizik za okoliš i ljudsko zdravlje (Landsiedel i sur., 2010; Beer i sur., 2012). Budući da biljke imaju značajnu ulogu u akumulaciji i bioraspodjeli mnogih ekoloških tvari, smatra se da bi mogle biti uključene u transportu AgNP i nakupljanju istih u hranidbenim lancima (Rico i sur., 2011). Biljke mogu biti izložene nanočesticama srebra neizravno, putem proizvoda koje ljudi korištenjem oslobađaju u okoliš (Luoma, 2008) i izravno primjenom komercijalno dostupnih proizvoda korištenih u

poljoprivredi (Sekhon, 2014). Naime, uporaba poljoprivrednih proizvoda koji sadrže AgNP, kao što su umjetna gnojiva i pesticidi, već je naveliko započela i srebro je danas prihvaćen agrokemijski proizvod jer uklanja neželjene mikroorganizme u tlu i hidroponičkim sustavima (Sharon i sur., 2010). Toksičnost AgNP dokazana je u mnogim vrstama kao što su bakterije (Suresh i sur., 2010), vodene (Fabrega i sur., 2009) i kopnene životinje i biljke (Monica i Cremonini, 2009; Ahamed i sur., 2010). Međutim, još uvijek je nejasno je li njihova toksičnost posljedica oslobađanja iona Ag^+ ili je uzrok toksičnosti sam oblik AgNP.

Toksičnost AgNP može ovisiti o molekulama koje omataju i stabiliziraju nanočestice (Tejamaya i sur., 2012; Silva i sur., 2014). Nanočestice srebra koje sam koristila u istraživanju stabilizirane su organskim omotačima koji omogućuju njihovo učinkovito raspršenje i daju im određeni naboj (Silva i sur., 2014). Citrat i polivinilpirolidon (PVP) u dosadašnjim su istraživanjima utjecaja nanočestica srebra u biljkama najčešće korišteni omotači, a cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) nerijetko se rabi kao omotač i za druge vrste nanočestica poput zlata (Cheung i sur., 2012) i magnetita, Fe_3O_4 (Faraji i sur., 2010). Citratni anioni nanočesticama srebra daju negativan, polivinilpirolidon slabo negativan, a cetiltrimetilamonijevi kationi pozitivan naboj.

1.2. Luk (*Allium cepa*) kao modelni organizam

Svoje sam istraživanje provodila na korijenima vrste *Allium cepa*. Luk je široko rasprostranjena biljka iz porodice Alliaceae, ima dvogodišnji razvoj i biljka je dugog dana. Raste na sunčanim područjima u rahlim humusnim tlima. Ima zaobljenu lukovicu obavijenu crvenosmeđim ljuskama koja stvara plitko, čupavo korijenje. Listovi su mu zeleni, cjevasti i šuplji, a na vrhu stabljike od lipnja do rujna stvara se kuglasti cvat sastavljen od mnogobrojnih zelenkastobijelih dvospolnih cvjetova. Luk je globalno korištena kulinarska namirnica čija godišnja proizvodnja prelazi nekoliko milijuna tona. Osim za prehranu ljudi, upotrebljava se i u zdravstvene svrhe kao ljekovita biljka bogata spojevima sumpora zbog kojih ima karakterističan miris i okus, flavonoidima, kromom i vitaminom C, te je od davnina poznat i priznat prirodni antibiotik i antipiretik.

No, više biljke nerijetko se upotrebljavaju i u znanstvenim istraživanjima u molekularnoj i staničnoj biologiji pa je tako i luk jedan od modelnih organizama. Levan (1938) ga je prvi put iskoristio u citogenetičkim testovima ispitivanja učinka kolhicina, a od tada se koristi kao bioindikator različitih kontaminacija ekosustava (Fatima, 2004), kao i za *in vivo* istraživanja u biologiji. Laka dostupnost i niska cijena, jednostavnost manipulacije s njim, kratko vrijeme klijanja, lak uzgoj i održavanje, a visoka osjetljivost na promjenu uvjeta, čine luk vrlo dobrim modelnim organizmom zbog čega sam ga i ja izabrala za svoje istraživanje. Dosadašnji znanstveni radovi s lukom kao središnjom biljnom vrstom uglavnom su rezultat toksikoloških ispitivanja koja pokazuju pojave bioakumulacije kemijskih supstanci u određenim biljnim tkivima (Geremias, 2011), inhibicije rasta korijena i listova (npr. Ghodake i sur., 2011), citogenetičkih ili mutagenih učinaka (npr. Kumari i sur., 2011) te općenito različitih odgovora na stres (npr. Geremias i sur., 2009).

1.3. Svjetlosna i transmisijska elektronska mikroskopija

Stanica je osnovna strukturna i funkcionalna jedinica svih poznatih organizama. Kako bi što bolje razumjeli kako stanica funkcionira prvo moramo razumjeti njenu strukturnu organizaciju. Zbog činjenice da je većina stanica premalena da bi se vidjele golim okom, istraživanje stanica uvelike ovisi o upotrebi mikroskopa.

Svjetlosni mikroskop optički je sustav sastavljen od dviju konvergentnih leća koje usmjeravaju vidljivu svjetlost: objektiva koji stvara povećanu realnu sliku predmeta i okulara koji daje povećanu virtualnu sliku tog predmeta (a od koje oko na mrežnici stvara ponovno realnu sliku). Ukupno povećanje mikroskopa umnožak je pojedinačnih uvećanja tih leća, a max. 1500x s granicom razlučivosti (koja ovisi o valnoj duljini svjetlosti) od 200 nm (Abramowitz, 2003). Zbog ograničene moći razlučivanja svjetlosnog mikroskopa, analiza pojedinosti stanične strukture zahtijevala je snažniju mikroskopsku tehniku - elektronsku mikroskopiju.

Transmisijski elektronski mikroskop je vrlo snažno analitičko oruđe koje omogućava vizualizaciju i analizu bioloških uzoraka na razini organela. Transmisijski elektronski mikroskop za stvaranje povećane slike ne koristi vidljivu svjetlost kao svjetlosni mikroskop, već snop elektrona (izvor je tzv. elektronski top) kojeg usmjerava

elektromagnetskim poljem (tzv. elektronskim lećama). Stvaranje kontrasta na elektronsko-mikroskopskoj slici temelji se na prolasku kroz preparat ili raspršenju snopa elektrona na njemu. Ubrzani elektroni u vakuumu imaju svojstvo vala čija je duljina mnogo kraća od valne duljine svjetlosti pa je moć razlučivanja elektronskog mikroskopa veća u usporedbi sa svjetlosnim. Današnji elektronski mikroskopi imaju povećanje do čak 1000000x, a maksimalna moć razlučivanja elektronskog mikroskopa za biološke uzorke iznosi od 1 do 2 nm. Elektronska mikroskopija je, ostvarujući detaljna ultrastrukturna istraživanja, iz temelja preinačila naše razumijevanje građe stanice. Neki se organeli (poput jezgre ili kloroplasta) dovoljno dobro vide i korištenjem svjetlosnog mikroskopa, ali se uz pomoć elektronskog mikroskopa mogu vršiti mnogo detaljnija istraživanja. Pored toga, elektronska mikroskopija otkrila je stanične strukture koje su premale da bi se mogle zamijetiti svjetlosnim mikroskopom. One uključuju ribosome, membrane, mikrotubule i mikrofilamente (Bozzola i Russell, 1998).

1.4. Proteomika

Riječ proteom spoj je pojmova protein i genom, a obuhvaća sve proteine i proteinske oblike koje organizam sintetizira tijekom života. Proteom nije statičan, već je podložan konstantnim promjenama ne samo zbog međudjelovanja s genomom nego i uslijed promjena okolišnih uvjeta (Wilkins i sur., 1996). U usporedbi s genomom, proteom je znatno kompleksniji sustav; njegovoj složenosti pridonosi alternativno procesiranje primarnog transkripta, različite kovalentne posttranslacijske modifikacije i ciljane degradacije proteina te mreže interakcija između samih proteina (Altelaar i sur., 2013). Istraživanja bioloških funkcija i struktura proteina zbog toga predstavljaju veliki izazov znanstvenicima.

U tehnologije koje se bave analizom svih članova određene skupine molekula spadaju primjerice genomika koja se bavi analizom gena, transkriptomika koja proučava mRNA, metabolomika koja se bazira na istraživanju kemijskih reakcija u kojima sudjeluju metaboliti specifičnih bioloških uzoraka te proteomika koja je relativno nova grana molekularne biologije, a bavi se sustavnom analizom ekspresije proteina, tj. opsežnim

kvantitativnim istraživanjem promjena u ekspresiji proteina pod specifičnim uvjetima (Anderson i Anderson, 1998; Kraljević Pavelić i Pavelić, 2009).

Ideja o analizi cijelog seta proteina nekog organizma pojavila se nakon razvitka metode dvodimenzionalne elektroforeze, tj. načina razdvajanja proteina dvjema jednodimenzionalnim elektroforetskim tehnikama (PAGE): izoelektričnim fokusiranjem i poliakrilamidnom gel elektroforezom, koje proteine separiraju prema dva različita fizikalno-kemijska svojstva (naboju i masi) (Margolis i Kenrick, 1969). Ova tehnika ima veliku moć razlučivanja, a metodom bojanja gelova bojom *Coomassie brilliant blue* (CBB) moguće je vizualizirati proteine prisutne u gelu u subpikomolarnim veličinama (James, 1997). Specijaliziranim računalnim programima analiziraju se zatim eventualne razlikovne ekspresije proteina nastale primjerice kao posljedica izlaganja biljke nekom stresoru.

1.4.1. Jednodimenzionalna elektroforeza; SDS-PAGE

Princip jednodimenzionalne elektroforeze temelji se na razdvajanju proteina prema jednom njihovom fizikalno-kemijskom svojstvu. Poliakrilamidna gel elektroforeza u denaturirajućim uvjetima zasniva se na separaciji proteina prema njihovoj masi. Otopina natrijeva dodecilsulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate*, SDS) djeluje denaturirajuće na mješavinu proteina, tj. dodatak anionskog detergenta SDS-a u gel rezultira nastajanjem kompleksa SDS-protein čime se postiže stalan naboj proteina i disocijacija na pojedinačne polipeptidne lance. Posljedično, elektroforetska pokretljivost proporcionalna je isključivo efektivnom promjeru molekule, tj. relativnoj molekulskoj masi tih proteina pri čemu se proteini veće molekulske mase kroz gel gibaju sporije nego proteini manje mase (Krsnik-Rasol i sur., 2004).

1.4.2. Dvodimenzionalna elektroforeza

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) metoda je istraživanja proteina koju je opisao O'Farrell (1975), a objedinjuje dva jednodimenzionalna elektroforetska postupka koja razdvajaju proteine na osnovu različitih fizikalno-kemijskih svojstava, npr. izoelektrično fokusiranje kao prvu dimenziju, u kojoj su proteini razdijeljeni prema naboju i

poliakrilamidnu gel elektroforezu kao drugu dimenziju, u kojoj su proteini razdijeljeni prema masi. Pomoću 2-DE moguće je analizirati kompleksne uzorke s i po nekoliko tisuća proteina sličnih fizikalno-kemijskih svojstava.

1.4.3. Spektrometrija masa

Napredak u istraživanju proteina postignut je razvojem tehnika ionizacije spojeva velikih molekulskih masa te korištenjem istih zajedno s metodama spektrometrije masa (MS). Spektrometrija masa je analitička metoda kojom se pomoću određivanja mase peptida ili proteina omogućuje identifikacija istih, određivanje njihovog aminokiselinskog slijeda, identifikacija i određivanje položaja posttranslacijskih modifikacija, određivanje mutacija te provjera strukture i čistoće proteina dobivenih genetskim inženjeringom. Nadalje, MS se primjenjuje i u istraživanju različitih interakcija između proteina i iona metala, malih organskih molekula i različitih bioloških spojeva (Galić i Cindrić, 2008).

Spektrometar masa sastoji se od ionizatora koji molekule prevodi u formu iona te analizatora koji ione sortira ovisno o omjeru njihove mase i naboja. Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) je relativno blaga tehnika ionizacije molekula, za koju analit ne mora biti hlapljiva smjesa molekula, a istovremeno može biti termolabilnih svojstava, zbog čega je pogodna za istraživanje proteina (Karas i Hillenkamp, 1988). Mehanizam ionizacije nije u potpunosti razjašnjen, ali predložena je teorija ionizacije koja se osniva na brzom prijenosu naboja između molekula matrice i analita u plinovitoj fazi. Ionizacija molekula rezultira spontanom fragmentacijom, a dobiveni se fragmenti ubrzavaju prema analizatoru (de Hoffmann i Stroobant, 2007). MALDI tehnika najčešće generira jednostruko nabijene molekulske fragmente koji su uglavnom dobiveni protonacijom (Galić i Cindrić, 2008).

MALDI tehnika ionizacije najčešće se koristi u spektrometrima masa s analizatorom koji mjeri vrijeme leta (eng. *Time Of Flight*, TOF), tj. vrijeme potrebno da nabijeni molekularni fragmenti stignu do analizatora, a što je upravo proporcionalno masi tih iona. Spektrometar masa koji sadrži dva analizatora TOF odvojena kolizijskom ćelijom (uređaj

MALDI TOF/TOF) može se koristiti za sekvenciranje proteina kroz proces tandemске spektrometrije masa (dalje u tekstu: MS/MS) koji uključuje snimanje spektra nekog uzorka, selektivno propuštanje nekoliko najjačih signala kroz prvi TOF uređaj, nasumično cijepanje odabranih peptida njihovim sudaranjem s molekulama dušika u kolizijskoj ćeliji i konačno razdvajanje dobivenih fragmenata u drugom TOF uređaju. Na kraju se fragmente identificira korištenjem složenih algoritama i pretraživanjem baza podataka (Paulo, 2012).

Prednost tehnike sekvenciranja proteina MS/MS je da se individualni peptidi ne moraju razdvajati iz kompleksnih smjesa, za razliku od metode Edmanove odgradnje. Nadalje, brzina rada, točnost mjerenih masa, kvaliteta MS/MS spektara i osjetljivost instrumenata MALDI-TOF/TOF uveliko nadmašuje performance klasičnog instrumenta MALDI-TOF (Medzihradszky i sur., 2000).

Suvremene proteomske tehnike moćan su alat za identifikaciju proteina povezanih s različitim okolišnim i/ili razvojnim signalima (Gygi i Aebersold, 2000). Metode koje se temelje na elektroforezi u gelu i spektrometriji masa, uspješno se koriste za razdvajanje, vizualizaciju i identifikaciju proteina uključenih u odgovor biljaka na stres (Zivy i de Vienne, 2000; Thiellement i sur., 2002). Iako je primjena proteomike doprinijela povećanju spoznaja o odgovoru biljaka na stres izazvan teškim metalima (Hosseini i Komatsu, 2013), o proteinima koji su uključeni u stres uzrokovan nanočesticama metala, a pogotovo srebra, gotovo se ništa ne zna.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na to da se nanočestice srebra danas koriste u mnogim područjima ljudske djelatnosti postavlja se pitanje sigurnosti njihove upotrebe za ekološke sustave i zdravlje ljudi. Danas postoji nekoliko istraživanja o toksičnosti nanočestica u stanicama sisavaca, ali gotovo da nema radova o genotoksičnom i citotoksičnom utjecaju nanočestica u biljnim stanicama. Stoga, kako bih doprinijela novim spoznajama o utjecaju nanočestica srebra na biljke, ovim ću istraživanjem ispitati učinak nanočestica i iona srebra na morfologiju stanice i proteom korijena luka te:

1. Utvrditi utječe li ispitivana koncentracija nanočestica srebra s različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) i ionskog srebra (AgNO_3) na morfologiju stanica korijena luka.
2. Identificirati proteine čiji se stupanj ekspresije mijenja u tkivu korijena luka uslijed izloženosti nanočesticama srebra s različitim omotačima i ionskom srebru.
3. Usporediti učinak ispitivane koncentracije nanočestica srebra (s različitim omotačma) na razlike u ekspresiji proteina, s utjecajem jednake koncentracije ionskog srebra na iste proteine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra redukcijским su postupkom pripravljene iz srebrova nitrata (AgNO_3), a zatim su stabilizirane pomoću tri vrste omotača: negativno nabijenog citratnog aniona, slabo negativno nabijenog polivinilpirolidona (PVP) te pozitivno nabijenog cetiltrimetilamonijevog kationa (CTAB). Tako su dobivene tri vrste nanočestica srebra: negativno nabijene (AgNP-citrat), slabo negativno nabijene (AgNP-PVP) i pozitivno nabijene (AgNP-CTAB). Laboratorijski sintetizirane nanočestice pripremila je Ivana Vinković-Vrčec s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

3.1.2. Biljni materijal

Istraživanje za svoj diplomski rad provodila sam na vrsti *Allium cepa* iz porodice Alliaceae. Luk je kultivirana i globalno rasprostranjena biljka, jedna od najzastupljenijih namirnica u svijetu, a ujedno i modelni organizam često korišten u eksperimentalne svrhe u molekularnoj i staničnoj biologiji. Lukovice sam tri dana ostavila uronjene u vodi, pazeći da zbog isparavanja vode ne ostanu na suhom, kako bi iz njih izrasli korijeni. Nakon toga glavice luka stavila sam u otopine jednakih koncentracija ($75 \mu\text{M}$) nanočestica srebra stabiliziranih trima različitim omotačima (citrat, PVP, CTAB) te u otopinu ionskog srebra (AgNO_3) iste koncentracije (Tablica 1). Korijene izrasle iz lukovica uronjenih u vodu, bez dodatka AgNP ili ionskog srebra, koristila sam kao kontrolu. Tretman izlaganja korijena navedenim otopinama trajao je 72 h, nakon čega sam tkivo uzorkovala za daljnju analizu.

Tablica 1. Primijenjeni tretmani nanočesticama srebra (AgNP) i ionskim srebrom (AgNO_3)

Tretman	Koncentracija (μM)
AgNP-citrat	75
AgNP-PVP	75
AgNP-CTAB	75
AgNO_3	75

3.2. Metode

3.2.1. Svjetlosna i elektronska mikroskopija

Za svjetlosnu i elektronsku mikroskopiju priredila sam prereze tkiva korijena uklopljenog u epoksidnu smolu.

3.2.1.1. Priprema uzoraka za svjetlosnu mikroskopiju

Prerezi uklopljenog materijala priređeni su u nekoliko zasebnih koraka prema Peharec Štefanić (2013).

A) Fiksacija i postfiksacija. Vršni dijelovi korijena luka dugački 5 mm i 1 cm izrezani su od ostatka korijena nakon 72 h izlaganja tretmanu. Komadići tkiva su fiksirani u Eppendorf tubicama 2%-tnim glutaraldehidom u 0,05 M kakodilatnom puferu (pH = 7,2). Pufer sam priredila otapanjem 4,28 g Na-kakodilata u 100 mL deH₂O te razrjeđivanjem 25 mL pripremljene otopine sa 75 mL deH₂O. Fiksacija je trajala 30 min pri temperaturi 1 °C. Nadalje, komadići tkiva su dva puta isprani s 1 mL kakodilatnog pufera, pri temperaturi 1 °C. Materijal je postfiksiran 1%-tnim osmijevim tetroksidom u 0,05 M kakodilatnom puferu (pH = 7,2) 60 min na temperaturi 1 °C te ispran kroz 10 min destiliranom vodom na istoj temperaturi.

B) Dehidracija. Nakon fiksacije i postfiksacije materijal sam dehidrirala na sobnoj temperaturi kroz seriju etanola, volumena 1 mL, rastuće koncentracije (50%, 60%, 70%, 80%, 96%), ostavljajući ih u svakoj po 10 min. Naposljetku sam materijal stavila u apsolutni (100%) etanol preko noći. Sljedeći sam dan uklonila apsolutni etanol, a dodala 1:1 smjesu etanola i acetona u kojoj sam komadiće tkiva držala 30 min. Nakon pola sata odvojila sam smjesu od komadića tkiva pa im dodala 100%-tni aceton u kojem sam ih ostavila idućih 30 min poslije čega je postupak dehidracije bio završen.

C) Uklapanje u Spurrovo sredstvo. Nakon dehidracije, komadiće tkiva uklopila sam u epoksidnu smolu, tj. Spurrovo sredstvo, stavljajući materijal u mješavine acetona i Spurrovog sredstva u različitim omjerima; najprije 30 min u mješavinu omjera 3:1, pa 30 min u 1:1, još 30 min u 1:3 te konačno u 100%-tno Spurrovo sredstvo, 3 h na 40 °C.

Komadiće tkiva za poprečne prereze (1 cm duljine) postavila sam u kalup okomito na njegov gornji rub, a komadiće tkiva za uzdužne prereze (5 mm duljine) vodoravno s gornjim rubom kalupa. Sredstvo s komadićem tkiva i papirićem s identifikacijskim brojem polimerizira u kalupu 48 h na 65 °C.

D) Za svjetlosnu mikroskopiju načinila sam poludebele prereze (1 µm) pomoću ultramikrotoma (model Sorvall RMC, Mt6000-XL ultramikrotom, Njemačka) te ih prenijela na predmetno stakalce u kapljicu 10%-tnog acetona. Predmetnicu sam zagrijala iznad šuštećeg plamena plinskog plamenika zbog čega je aceton brzo ispario, a poludebeli se prerez zalijepio za stakalce. Prerez sam zatim obojala mješavinom 2%-tnog toluidinskog modrila i 2%-tnog boraksa u omjeru 1:1 (kapljice dviju otopina promiješala sam histološkom iglicom na predmetnom stakalcu) provlačenjem desetak sekundi kroz plamen plinskog plamenika, nakon čega sam pod mlazom vode isprala višak boje s predmetnice. Na uzorke sam stavila pokrovno stakalce pa ih analizirala svjetlosnim mikroskopom (model BX51, Olympus, Japan) i snimila digitalnom kamerom (model DP70, Olympus, Japan).

3.2.1.2. Priprema uzoraka za transmisiju elektronsku mikroskopiju

Za transmisiju elektronsku mikroskopiju koristila sam tkivo uklopljeno u epoksidnu smolu već pripremljeno za svjetlosnu mikroskopiju. Ultratanke prereze (50-90 nm) načinila sam pomoću ultramikrotoma (model Ultracut R, Leica, Njemačka). Iste sam potom 10 min kontrastirala 4%-tnom vodenom otopinom uranil acetata, a zatim 10 min olovnim citratom (pH = 12) (Reynolds, 1963). Ultratanke prereze analizirala sam transmisijskim elektronskim mikroskopom (model Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri 70 kV.

3.2.2. Fenolna ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Korijene luka isprala sam pod vodom, osušila papirnatim ručnicima te za svaku od tri replike izvagala 1,65 g tkiva za što su mi bili potrebni korijeni 5 lukovica koje su rasle u vodi i otopinama s AgNP, dok sam za istu masu tkiva tretiranog otopinom srebrova nitrata trebala izrezati korijene 10 lukovica. Pripremila sam ekstrakcijski pufer (Tablica 2) i pohranila ga u stiropornu posudu s ledom. Za svaku repliku od 1,65 g korijena (po tri replike za svaku od četiri vrste tretiranog i jednog kontrolnog tkiva tj. ukupno petnaest uzoraka) načinila sam postupak fenolne ekstrakcije ukupnih topivih proteina prema Faurobert i sur. (2007).

Izvagane korijene stavila sam u ohlađeni tarionik, kako bi iz njih ekstrahirani proteini ostali neoštećeni (jer niska temperaturu smanjuje aktivnost proteinaza), narezala ih na sitnije dijelove pa im dodala 4,5 mL ekstrakcijskog pufera i homogenirala tučkom. Homogenat sam prebacila u Falcon tubicu od 15 mL, promiješala na vorteksu (IKA, Njemačka) pa inkubirala 10 min u ledu na miješalici (Stuart, UK). Potom sam sadržaju u Falcon tubici dodala 4,5 mL fenola i sve zajedno promiješala na vorteksu te inkubirala 10 min na miješalici pri sobnoj temperaturi. Homogenat s dodanim puferom i fenolom centrifugirala (Hettich, Njemačka) sam 20 min na 5500 *g* pri 4 °C, a nakon toga sam pipetom prebacila supernatant, fenolnu fazu, u novu Falcon tubicu od 15 mL. Na odvojeni supernatant dodala sam 3 mL ekstrakcijskog pufera pa promiješala sadržaj na vorteksu i centrifugirala na 5500 *g* pri 4 °C idućih 20 min. Dobiveni supernatant sam prebacila u novu Falcon tubicu od 15 mL i dodala 8 mL ledeno hladne precipitacijske otopine (Tablica 3), promiješala sadržaj okretanjem u ruci i stavila na precipitaciju preko noći na -20 °C da bi se istaložili proteini.

Tablica 2. Sastav pufera za fenolnu ekstrakciju ukupnih topivih proteina (fenilmetilsulfonyl fluorid (PMSF) otopljen u 96% EtOH i 2% β -merkaptoetanol dodaju se neposredno prije upotrebe, čuva se na ledu)

PUFER ZA EKSTRAKCIJU, 150 mL	
Tris	9,25 g
EDTA	2,80 g
saharoza	35,94 g
KCl	1,1 g
reH ₂ O	do 50 mL
PMSF	0,0261 g
96% EtOH	3 mL
2% β -merkaptoetanol	3 mL

Tablica 3. Sastav precipitacijske otopine (čuva se na -20 °C)

PRECIPITACIJSKA OTOPINA, 400 mL	
amonijev acetat	3,08 g
MeOH	400 mL

Istaložene proteine sakupila sam centrifugiranjem sadržaja u Falcon tubicama tijekom 20 min na 5500 *g* pri 4 °C, nakon čega sam supernatant izlila u otpad. Na preostali talog dodala sam 3 mL ledene precipitacijske otopine i resuspendirala ga pipetom. Sadržaj sam centrifugirala 10 min na 5500 *g* pri 4 °C, poslije čega sam ispiranje taloga ponovila još dvaput, centrifugirajući uzorke na već opisan način između svakog ispiranja. Zbog toga što u nastavcima za pipetu ostaje mala količina proteina iste sam koristila za sva tri ispiranja taloga. Nakon trećeg desetominutnog centrifugiranja izlila sam supernatant, a dodala 3 mL ledenog acetona na zaostali talog u Falcon tubicama. Sadržaj sam centrifugirala na isti način, a supernatant uklonila iz Falcon tubica pa ih položila horizontalno u digestor kako bi se u njima osušio preostali talog. S Falcon tubicama dalje sam radila izvan stiroporne posude s ledom.

Osušeni talog resuspendirala sam u 500 μ L pufera za izoelektrično fokusiranje s dodatkom ditiotreitola (DTT) i amfolita (dalje u tekstu: IEF pufer) (Tablica 4). IEF pufer sastoji se od kemikalija koje će u pojedinom koraku pripreme uzorka spriječiti neželjen proces agregacije proteina (urea), onemogućiti oksidaciju proteina (DTT), pojačati topljivost hidrofobnih proteina (3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat (CHAPS)) te deaktivirati proteaze i razoriti disulfidne mostove što će dovesti do disocijacije oligomernih i multiproteinskih kompleksa na izdvojene podjedinice. Amfoliti su amfoterne molekule visokog puferskog kapaciteta koje se pod djelovanjem električnog polja gibaju i zaustavljaju u mjestima vrijednosti izoelektričnih točaka formirajući uske zone, tvoreći tako kontinuirani gradijent pH potreban za provođenje izoelektričnog fokusiranja (Lopez, 2007). Kako se osušeni talog ne otapa lako u IEF puferu Falcon tubice s talogom i puferom stavila sam 10 min na tresilicu, a nakon toga dodatno sam pokušala razbiti taloge u ultrazvučnoj kupelji (model Sonorex, Bandelin, Njemačka) držeći Falcon tubice 45 s u istoj. Cijeli sam postupak ponovila još dvaput do potpunog otapanja taloga nakon čega sam tekući sadržaj Falcon tubice prebacila u čiste Eppendorf tubice od 1,5 mL i centrifugirala (Eppendorf, Njemačka) 5 minuta na 20800 *g* pri sobnoj temperaturi. Supernatant sam pipetom prebacila u čiste Eppendorf tubice od 1,5 mL, a talog i korištene tubice bacila.

Tablica 4. Sastav pufera za izoelektrično fokusiranje (priređen otapanjem ureje i CHAPSa u posudi s toplom vodom jer urea kristalizira na sobnoj temperaturi, a pohranjen u alikvotima od 1 mL na -20 °C; DTT (2 mg/mL) i amfoliti (5,2 μ L/mL) dodaju se u otopljeni pufer neposredno prije upotrebe)

IEF PUFER, 10 mL	
urea	5,4 g
CHAPS	0,2 g
reH ₂ O	do 10 mL
DTT	20 mg
Amfoliti	52 μ L

3.2.2.1. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima za jednodimenzionalnu i dvodimenzionalnu elektroforezu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Supernatant dobiven fenolnom ekstrakcijom koristila sam kao sirovi ekstrakt u kojemu sam određivala koncentraciju proteina modificiranom spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (Faurobert i sur., 2007) koja se od originalne (Bradford, 1976) razlikuje po dodatku 0,1 M HCl koja zakiseljuje otopinu što pospješuje vezanje proteina za boju CBB, koja je sastavni dio Bradford otopine, usprkos interferenciji nekih komponenata IEF pufera. Za početak sam napravila Bradford matičnu otopinu, a iz nje radnu Bradford otopinu (Tablica 5).

Tablica 5. Sastav matične i radne Bradford otopine (čuvaju se u tamnoj boci na sobnoj temperaturi)

MATIČNA OTOPINA BRADFORD, 650 mL		RADNA OTOPINA BRADFORD, 500 mL	
96% EtOH	100 mL	96% EtOH	15 mL
88% H ₃ PO ₄	200 mL	88% H ₃ PO ₄	30 mL
boja CBB	350 mL	Bradford matična otopina	30 mL
		reH ₂ O	425 mL

Za svaki od 15 uzoraka u Falconicama sam pomiješala 0,1 M klorovodičnu kiselinu, uzorak, redestiliranu vodu i radnu Bradford otopinu (Tablica 5) prema Tablici 6. U slijepoj probi zamijenila sam uzorak s IEF puferom. Uzorak u Falcon tubicama kratko sam promiješala na vorteksu pa ostavila 10 min u mraku (jer je Bradford otopina osjetljiva na svjetlo), nakon čega sam uzorke prebacila u kivetu. Intenzitet plavog obojenja, nastalog u reakciji proteina i Bradford otopine, spektrofotometrijski sam mjerila na valnoj duljini od 595 nm (model UV/VIS, Unicam, Engleska). Koncentraciju proteina u svakom uzorku, izraženu u mg mL⁻¹, odredila sam očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina albumina goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL⁻¹) pripremljenih u IEF puferu.

Tablica 6. Sastav otopina za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije fenolom ekstrahiranih proteina prema modificiranoj metodi po Bradfordu (Faurobert i sur., 2007)

OTOPINA S UZORKOM		SLIJEP A PROBA	
0,1 M HCl	10 µL	0,1 M HCl	10 µL
uzorak	20 µL	IEF pufer	20 µL
reH ₂ O	70 µL	reH ₂ O	70 µL
Bradford radna otopina	3,5 mL	Bradford radna otopina	3,5 mL

3.2.3. Analiza proteina

3.2.3.1. Razdvajanje proteina jednodimenzionalnom SDS-PAGE (1-DE)

Natrij dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezu (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) napravila sam prema metodi koju je opisao Laemmli (1970), u sustavu *PROTEAN II xi cell* (Bio-Rad, SAD). Najprije sam pripremila otopinu za donje gelove, tj. gelove za razdvajanje (Tablica 7) te ih (40 mL) izlila u sendvič sastavljen od dviju staklenih ploča odvojenih razmaknicom (prije izljevanja gelova, vodom sam provjerila jesu li sve komponente dobro pričvršćene). Gelove sam zatim nadsvodila vodom i ostavila da polimeriziraju oko 45 min. Vodu iznad gelova sam nakon toga izlila, napravila otopinu za gornji gel, tj. gel za koncentriranje (Tablica 7) pa ga izlila između staklenih ploča na prethodno polimerizirani donji gel i u njega stavila “češljic” koji služi za stvaranje jažica.

Tablica 7. Sastav gela za razdvajanje (12%-tni) i koncentriranje (4%-tni) (dodatkom amonijeva peroksodisulfata (APS) i N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) počinje polimerizacija pa se isti dodaju netom prije ulijevanja otopine između ploča) za 1-DE u sustavu *PROTEAN II xi cell*

GEL ZA RAZDVAJANJE, 40 mL		GEL ZA KONCENTRIRANJE, 10 mL	
reH ₂ O	14 mL	reH ₂ O	6,1 mL
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	10 mL	1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	2,5 mL
30% AA/Bis	16 mL	30% AA/Bis	1,3 mL
10% SDS	0,4 mL	10% SDS	100 µL
10% APS	0,2 mL	10% APS	50 µL
TEMED	20 µL	TEMED	10 µL

Uzorke za nanošenje na gel pripremila sam miješanjem određenih volumena proteinskih ekstrakata (ovisno o koncentraciji proteina izmjerenoj u svakome od uzoraka) s puferom za denaturaciju uzoraka (eng. *sample buffer*) (Tablica 8) u omjeru 4:1 da bih postigla jednake količine proteina u svim uzorcima na gelu. Nakon toga, uzorke sam denaturirala na termobloku 5 min pri 95 °C. Potom sam Hamilton špricom nanijela uzorke (12 µg proteina) u jažice gela pa staklene ploče pričvrstila na elektrodni nosač i prenijela ga u kadu u koju sam ulila elektrodni pufer (Tablica 9). Elektroforeza je tekla prvih 45 min pri 100 V, kako bi uzorci ušli u gel za razdvajanje, a zatim pri 220 V do njenog završetka.

Tablica 8. Sastav pufera za denaturaciju uzoraka (eng. *sample buffer*)

SAMPLE BUFFER, 25 mL	
glicerol	8 mL
20% SDS	5 mL
0,5 M Tris-HCl (pH = 6,9)	6,25 mL
β-merkaptioetanol	2,5 mL
0,5% bromfenol plavo	0,5 mL
reH ₂ O	do 25 mL

Tablica 9. Sastav koncentriranog elektrodnog pufera (prije upotrebe razrijedi se 10 puta)

ELEKTRODNI PUFER, 1L	
Tris	30 g
glicin	144 g
SDS	10 g
6 M HCl	do pH = 8,3
reH ₂ O	do 1 L

3.2.3.2. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom SDS-PAGE (2-DE)

3.2.3.2.1. Rehidracija imobilina

Uzorke poznatih koncentracija proteina razrijedila sam s IEF puferom u čistim Eppendorf tubicama od 1,5 mL na koncentracije od 1,4 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, 1,6 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ i 1,8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (Tablica 10) nakon čega sam u svaku tubicu dodala 5 μL bromfenol plavog, promiješala na vorteksu i centrifugirala (Eppendorf, Njemačka) 5 min na 20800 *g* pri sobnoj temperaturi. U posudu za rehidraciju prebacila sam po 300 μL svakog uzorka i u njih stavila imobiline (eng. *Immobiline DryStrip*), trake dugačke 7 cm s gradijentnim gelom (pH = 3-10) okrenutim prema dolje. Imobiline sam prelila s 900 μL mineralnog ulja (*Cover Fluid*) kako bih spriječila isušivanje i kontaminaciju gelova. Tako pripremljene ostavila sam da se rehidriraju 14 sati (preko noći) na sobnoj temperaturi.

Tablica 10. Priprema otopina uzoraka s jednakim koncentracijama proteina (uzorak se razrijedi s IEF puferom do 350 μL)

	1,4 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		1,6 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		1,8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	
	V (uzorak)	V (IEF)	V (uzorak)	V (IEF)	V (uzorak)	V (IEF)
kontrola	253 μL	97 μL	311 μL	39 μL	266 μL	84 μL
AgNP-citrat	350 μL	0 μL	296 μL	54 μL	290 μL	60 μL
AgNP-PVP	276 μL	74 μL	332 μL	18 μL	289 μL	61 μL
AgNP-CTAB	250 μL	100 μL	350 μL	0 μL	246 μL	104 μL
AgNO ₃	212 μL	138 μL	231 μL	119 μL	239 μL	111 μL

3.2.3.2.2. Izoelektrično fokusiranje – prva dimenzija

Za razdvajanje proteina prema njihovim pI vrijednostima u gradijentu pH koristila sam metodu prema Bjellqvistu (1982). Nakon rehidracije, imobiline sam ocijedila o papirnati ručnik te prebacila na keramičku podlogu na uređaj za izoelektrično fokusiranje (model Ettan IPGphor 3, GE, Healthcare, UK) pazeći pritom na duljinu gelova i njihovu orijentaciju. Na krajeve imobilina uzdužno sam postavila elektrodne papiriće, koje sam prethodno navlažila sa 150 μ L deH₂O, tako da je pola elektrodnog papirića bilo na gelu, a pola izvan njega. Zatim sam pričvrstila elektrode, pazeći pritom da ista sjedne i na gel i na elektrodni papirić. Cijeli keramički nosač prekrila sam sa 110 mL mineralnog ulja *Cover Fluid* i pokrenula izoelektrično fokusiranje pod uvjetima navedenima u Tablici 11. S obzirom na to da se proteini sastoje od bazičnih i kiselih aminokiselinskih ostataka koji nose naboje, isti se u električnom polju gibaju prema suprotno nabijenim elektrodama sve dok ne dostignu pH vrijednost pri kojoj je ukupan naboj proteina jednak nuli, tj. vrijednost izoelektrične točke (Lopez, 2007). Kad je izoelektrično fokusiranje završilo ocijedila sam imobiline i pospremila ih na -80 °C.

Tablica 11. Uvjeti pri kojima se odvijalo izoelektrično fokusiranje

KORAK	PORAST NAPONA	OSTVARENI NAPON (V)	TRAJANJE (h)
1	Gradient	500	1:00
2	Gradient	1000	1:00
3	Gradient	8000	1:00
4	Hold	8000	8:00

3.2.3.2.3. Ekvilibracija imobilina

Izvadila sam imobiline s -80 °C pa ih ostavila 5 min da se otapaju. Radi redukcije postojećih disulfidnih mostova unutar proteina, na tresilici sam inkubirala svaku imobilinsku traku 15 min u 2 mL ekvilibracijskog pufera (Tablica 12) s dodatkom DTTa. Potom sam trake još 15 min inkubirala na tresilici u puferu za ekvilibraciju s dodatkom

jodacetamida (IAA) koji onemogućava stvaranje novih disulfidnih mostova između cisteinskih ostataka unutar proteina alkiliranjem sulfhidrilnih skupina.

Tablica 12. Sastav pufera za ekvibraciju imobilina (čuva se na sobnoj temperaturi, DTT i IAA zasebno se otope u puferu neposredno prije upotrebe)

PUFER ZA EKVILIBRACIJU, 50 mL	
urea	18 g
Tris-HCl (pH = 8,8)	1,66 mL
20% SDS	5 mL
reH ₂ O	do 50 mL
DTT	0,04 g / 2 mL pufera
IAA	0,05 g / 2 mL pufera

3.2.3.2.4. SDS-PAG elektroforeza – druga dimenzija

Nakon izoelektričnog fokusiranja, ukupne topive proteine prema njihovoj masi razdvojila sam pomoću 12%-tne vertikalne SDS-PAG elektroforeze prema metodi kako ju je opisao Laemmli (1970), u sustavu *Mini Protean II* (BioRad, SAD). Pripremila sam otopinu za gelove prema Tablici 13 pa ih izlila između dviju staklenih ploča razdvojenih 1 mm debelim razmaknicama i nadsvodila vodom (jer kontakt sa zrakom spriječava polimerizaciju). Nakon polimerizacije gelova vodu sam odlila, a ekvilibrirane imobiline umočila u elektrodni pufer (Tablica 9) pa ih položila na priređeni SDS gel za razdvajanje. Na komadić Whatmann filtera papira kapnula sam 4 µL biljega molekulskih masa te ga stavila na gel uz desni (-) kraj trake. Sve sam zatim prelila 0,5%-tnom otopinom agaroze (Tablica 13), pričekala da se ista stvrdne pa sendvič od staklenih ploča pričvrstila na elektrodni nosač te prenijela u kadu s elektrodnim puferom. Pokrenula sam elektroforezu koja se odvijala pri konstantnom naponu od 100 V prvih 15 min (vrijeme potrebno da proteini uđu u gel za razdvajanje) te pri naponu od 220 V do kraja elektroforeze (oko 30 min).

Tablica 13. Sastav gela za razdvajanje (12%-tni) i otopine agaroze (zagrije se prije upotrebe) za nadsvođivanje imobilina za drugu dimenziju u sustavu *Mini Protean II*

GEL ZA RAZDVAJANJE, 10 mL		0,5% AGAROZA, 25 mL	
reH ₂ O	3,35 mL	agarosa	125 mg
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	2,5 mL	elektrodni pufer	25 mL
30% AA/Bis	4,0 mL	bromfenol plavo	25 µL
10% SDS	100 µL		
10% APS	50 µL		
TEMED	5 µL		

3.2.3.3. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue (CBB)*

Prema Balen i sur. (2011) 1-D i 2-D gelove sam nakon elektroforeze 2 h inkubirala na tresilici pri sobnoj temperaturi u otopini za bojenje (0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina). Nakon toga gelove sam stavila na odbojavanje u otopinu za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina, 10% (v/v) etanol), također na tresilici pri sobnoj temperaturi, mijenjajući otopinu za odbojavanje nekoliko puta sve dok se pozadina gela nije obezbojila. Gelove sam nakon toga izvadila iz otopine, skenirala pomoću skenera (model Epson Perfection, V700 Photo, SAD) i pohranila u 10%-tnoj octenoj kiselini na +4 °C.

3.2.3.4. Snimanje i analiza gelova

Računalnim programom Image Master 2D Platinum analizirani su svi gelovi za svaki tretman kao i za kontrolu. Tako sam dobila kvantitativni i kvalitativni razlikovni prikaz ekspresijskih profila proteina kontrolnog i tretiranih uzoraka. Proteinske spotove koji su bili različito eksprimirani u kontrolnom i tkivu podvrgnutom tretmanu nanočesticama srebra odabrala sam za daljnju analizu spektrometrijom masa, ali sam izabrala i nekoliko proteinskih spotova čija se ekspresija nije razlikovala.

3.2.3.5. Analiza proteina spektrometrijom masa

Spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju omjera njihovih masa i naboja, a koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju raznovrsnih smjesa molekula. Spektrometar masa sastoji se od ionizatora koji molekule prevodi u formu iona, analizatora koji sortira ione ovisno o omjeru naboja i mase, detektora koji registrira ione i računala koje procesira podatke i prikazuje ih u obliku masenog spektra.

3.2.3.5.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu

Odabrane proteinske mrlje izrezala sam iz gela pomoću plastičnog nastavka za pipetu kojom sam odrezala oko 1 cm od vrha. Izrezane komadiće gela prebacila sam u Eppendorf tubice od 1,5 mL u koje sam prethodno dodala 1 mL otopine za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina, 40% (v/v) metanol) te ih odbojavala na termo-miješalici preko noći na 350 rpm pri sobnoj temperaturi. Komadiće gela koji se nisu obezbojili zagrijavala sam u mikrovalnoj pećnici na *defrost* opciji do obezbojenja.

3.2.3.5.2. Digestija proteina u gelu

Od potpuno odbojenih komadića gela pipetom sam odvojila otopinu za odbojavanje (kako je komadić gela bezbojan i sitan, na veći plastični nastavak za pipetu stavila sam manji da bih osigurala da u njega osim otopine za odbojavanje ne uvučem i gel). Na komadiće gelova dodala sam 500 μ L 50 mM pufera amonijevog hidrogenkarbonata (NH_4HCO_3) pH = 7,8 koji stvara optimalan pH za rad tripsina. Gelovi su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min uz protresanje na 400 rpm u termo-miješalici. Nakon isteka vremena otopina je uklonjena pipetom te je postupak ponovljen još dva puta, s time da je po zadnjem dodatku otopine, uzorak inkubiran 30 min. Nakon inkubacije sam uklonila otopinu, a svakome geliću dodala 500 μ L otopine 50 mM NH_4HCO_3 i acetonitrila volumnih omjera 1:1 (pripremljena miješanjem 200 mL 50 mM NH_4HCO_3 (pH = 7,8) i 200 mL acetonitrila) te inkubirala 30 min u termo-miješalici na 400 rpm pri sobnoj temperaturi. Nakon pola sata tu sam otopinu izvadila iz Eppendorf tubica, a dodala 100 μ L 100%

acetonitrila pa u njemu 5 min inkubirala gelove na termo-miješalici. Nakon inkubacije u čistom acetonitrilu gel se skupio i pobijelio jer acetonitril na sebe veže vodu iz gela čime kasnije u postupku omogućuje potpuno prodiranje otopine tripsina u gel bez neželjenog razrjeđivanja. Acetonitril sam nakon inkubacije uklonila iz Eppendorf tubica pa ih stavila na sušenje uparivanjem u vakuum centrifugi (model Concentrator 5301, Eppendorf, Njemačka, dalje u tekstu: SpeedVac), 15 min na 45 °C. Osušene gelove prebacila sam u Eppendorf tubice od 200 µL (vrlo pažljivo jer su komadići gelova nakon sušenja vrlo lagani) i dodala 10 µL otopine tripsina koncentracije 10 µg mL⁻¹ u 25 mM NH₄HCO₃ (pH = 7,8) koja je pripremljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg mL⁻¹ u 25 mM NH₄HCO₃ (pH = 7,8). Sadržaj u tubicama centrifugirala sam (model MiniSpin, Eppendorf, Njemačka) nekoliko sekundi kako bih sav sadržaj sabila na njeno dno i tako osigurala da komadić gela bude prekriven tripsinskim puferom. Uzorci su inkubirani 18 h na 37 °C u termo-miješalici uz protresivanje na 400 rpm kako bih osigurala uspješnu digestiju proteina dodanim tripsinom.

3.2.3.5.3. Ekstrakcija peptida iz gela

Nakon digestije, od komadića gelova odvojila sam pufer s tripsinom u Eppendorf tubice od 1,5 mL te ga kroz 15 min pri 45 °C uparila na SpeedVac-u. Komadićima gela zaostalima u Eppendorf tubicama od 0,2 mL dodala sam 10 µL otopine za ekstrakciju, tj. 50% (v/v) otopine 5%-tne trifluoroctene kiseline (TFA) u acetonitrilu pa ih inkubirala u ultrazvučnoj kupelji (model Ultrasonic Cell Disruptor XL, Misonix Inc., SAD) 30 min pri sobnoj temperaturi da bih zaostale peptide ekstrahirala iz gela. Nakon sonifikacije, komadiće gelova dodatno sam inkubirala u istoj otopini za ekstrakciju na termo-miješalici 15 min na 400 rpm pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, odvojila sam ekstrakte od komadića gelova i prebacila ih u Eppendorf tubice od 1,5 mL u kojima su se već nalazili osušeni peptidi te ih ponovno stavila na sušenje u SpeedVac pri istim uvjetima. Osušene peptide pospremila sam na -80 °C.

3.2.3.5.4. Derivatizacija peptida uz kemijski potpomognutu fragmentaciju

Na osušene peptide dodala sam 20 μL derivatizacijske otopine priređene prema Tablici 14, resuspendirala pipetom, promiješala na vorteksu pa kratko centrifugirala da se sadržaj sabije na dno Eppendorf tubice. Otopina za derivatizaciju sadrži 1 g L^{-1} CAF reagensa (sadrži 4-formil-1,3-benzen-disulfonsku kiselinu) i 4 g L^{-1} natrijevog cijanoborhidrida (NaCNBH_3) u 10 mM kalijevom hidrogenfosfatnom puferu ($\text{pH} = 5,0$). Njih sam potom (po 10 tubica odjednom) složila u obliku kruga na stiroporni stalak i stavila u mikrovalnu pećnicu 8 min na 180 W.

Tablica 14. Sastav derivatizacijske otopine za derivatizaciju peptida uz kemijski potpomognutu fragmentaciju (CAF reagens sadrži 4-formil-1,3-benzen-disulfonsku kiselinu, kalijev hidrogenfosfatni pufer ima $\text{pH} 5,0$)

DERIVATIZACIJSKA OTOPINA, 2 mL			
otopina NaCNBH_3		4:1	CAF otopina
NaCNBH_3	4 mg		CAF
10 mM KH_2PO_4	1 mL		10 mM KH_2PO_4
			1 mg
			1 mL

3.2.3.5.5. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C₄

Pročišćavanje peptida radila sam pomoću posebnih nastavaka za automatske pipete, tzv. ZipTip nastavaka (Agilent Technologies, SAD) koji na svome vrhu imaju malenu kolonu na koju se u određenim uvjetima vežu peptidi. Prije pročišćavanja ekstrakata, kolone sam kondicionirala ispiranjem pet puta s 10 μL otopine 80% (v/v) acetonitrila u 0,1% TFA, tri puta s 10 μL otopine 50% (v/v) acetonitrila u 0,1% TFA i konačno tri puta s 10 μL 0,1% TFA, osobito pazeći da niti u jednom trenu u pipetu ne uđe zrak. Pročišćavanje uzoraka započela sam nanošenjem uzoraka na kolonu tako da sam 10 puta provlačila pipetom uzorak kroz kondicionirani ZipTip. Peptide koji su se vezali na kolonu pročišćavala sam od soli ispiranjem 5 puta s 10 μL otopine 0,1% TFA. Pročišćene peptide s kolone sam eluirala pomoću 10 μL 80% (v/v) acetonitrila (u ovom je slučaju organsko otapalo u kojem se peptidi bolje otapaju no u hidrofobnoj sredini kakva je u matriksu ZipTip-a) u 0,1% TFA. Tu

sam otopinu također 10 puta provlačila kroz ZipTip, ali u čistoj Eppendorf tubici. Deseti put sam istisnula sav sadržaj u Eppendorf tubicu te sam na taj način pročišćene peptide osušila na SpeedVac-u.

3.2.3.5.6. Analiza peptida spektrometrom masa

Osušene pročišćene peptide resuspendirala sam pipetom u 4 μL matrice, tj. otopine α -ciano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA), koncentracije 5 mg mL^{-1} , u smjesi acetonitrila i 0,1% TFA u omjeru 1:1. Matrica u tehnici matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem djeluje kao nosač peptida koji se, nakon zagrijavanja i fotoionizacije laserom, raspršuje u vakuumu spektrometra masa zajedno s peptidima što MALDI tehniku ionizacije uzoraka čini pogodnom za prevođenje velikih nehlapljivih molekula, kao što su peptidi, iz čvrste u plinovitu fazu (Karas i Hillenkamp, 1988). Uzorke sam nakon otapanja nanijela na MALDI pločicu na kojoj je, istodobno s matricom, kokristalizirao i analit i na taj se način uklopio u kristale matrice. Pločicu sam nakon sušenja na zraku stavila u spektrometar masa MALDI-TOF/TOF (model 4800 Plus analyzer, Applied Biosystems, SAD). Na analit uklopljen u kristale matrice usmjerava se kratki laserski puls jakog intenziteta zračenja (UV ili IR). Molekule matrice desorbiraju zrake te uslijed oslobađanja velike količine topline dolazi do sublimacije površinskog sloja kristala matrice i oslobađanja intaktnog analita iz nje. Analizatori masa u uređaju mjere vrijeme leta (eng. *Time Of Flight*, TOF), tj. ono vrijeme koje je potrebno čestici da prođe kroz uređaj te prema brzini čestice, koja ovisi o njezinoj masi, određuju njenu veličinu ispisivanjem spektra MS, a prema potrebi mogu cijepati i odabrane čestice propuštene kroz prvi TOF uređaj u kolizijskim ćelijama i određivati im masu propuštanjem kroz drugi TOF uređaj ispisivanjem spektra MS/MS.

Tablica 15. Parametri analize MALDI-TOF/TOF

Tip analize	MS	MS/MS	MS	MS/MS
Detekcija iona	pozitivna	pozitivna	negativna	negativna
Zrcalo	reflektron	reflektron	reflektron	reflektron
Broj snimaka/spektra	80	120	80	120
Raspon masa/Da	900-4000	900-4000	900-4000	900-4000
Brzina snimanja/Hz	200	200	200	200
Kolizijski plin	isključen	Isključen	Isključen	isključen

3.2.3.5.7. Obrada podataka – identifikacija homolognih proteina

Dobivene spektre masa MS/MS koristila sam za daljnju pretragu NCBI nr/Plants baze podataka pomoću specijaliziranog računalnog programa ProteinReader (patent – Institut Ruđer Bošković i Prehrambeno-biotehnološki fakultet) s integriranim algoritmom za pretraživanje proteinskih baza podataka. Iz dobivenih MS/MS spektara, na temelju razlike u masama između pojedinih signala spektra, iščitava se slijed aminokiselina fragmentiranih peptida koje posebni algoritmi računalnog programa vezanog uz MALDI-TOF/TOF instrument preklapaju i slažu u cjelinu. Preklapanje se obavlja usporedbom s bazom podataka prema algoritmu najveće sličnosti uz pretragu iste baze uz korištenje BLAST Blossom 80 pretražnog algoritma. U konačan ishod pretrage, nakon probira pogodaka potvrđenih u slučaju preklapanja prema sličnosti i *de novo* iščitavanja, u obzir sam uzimala samo pogotke koji su se pojavljivali u obje pretrage. Na taj sam način mogućnost pogreške svela na najmanju moguću vrijednost, s obzirom na to da navedene peptidne sekvence ne postoje u bazama podataka za *Allium cepa* pa je pretraga izvršena prema načelu homolognosti.

Iz tako iščitanih aminokiselinskih slijeda, identificira se protein kojemu ta sekvencija pripada uspoređivanjem izmjerenih masa signala dobivenih spektara s teoretski izračunatim masama peptida pohranjenima u bazama podataka. Proteini iz korijena luka vrste *Allium cepa* su pronađeni prema homologiji s deset vrsta: *Zea mays* (kukuruz), *Cicer arietinum* (slanutak), *Fragaria vesca subsp. vesca* (jagoda), *Nicotiana tabacum* (duhan),

Fusarium pseudograminearum CS3096 (gljivica-patogen koja napada pšenicu), *Oryza sativa* Indica Group (riža), *Vitis vinifera* (vinova loza), *Oryza sativa* Japonica Group (riža), *Brachypodium distachyon* (trava) i *Oryza sativa* (riža) s kojima je *Allium cepa* pokazao najveću homologiju prema ukupnoj NCBI nr/Plants bazi podataka. Parametri pretrage mogu se isčitati iz tablice 16, a parametri za *de novo* sekvenciranje iz tablice 17.

Nadalje, za svaki identificirani protein, tj. pronađeni homologni protein iz druge biljne vrste, pronašla sam pomoću Uniprot baze podataka njegovu molekularnu funkciju, biološku kategoriju i staničnu komponentu u kojoj protein djeluje. Proteine sam kategorizirala prema zajedničkim biološkim kategorijama.

Tablica 16. Prikaz parametara pretrage homolognih proteina

PARAMETAR	VRIJEDNOST
Tolerancija pogreške u masi peptida (MS)	0,3
Tolerancija pogreške u masi b-iona	0,3
Tolerancija pogreške u masi y-iona	0,3
Minimalni % pokrivenosti (očitanja) sekvence	10,0
Maksimalni broj pogodaka peptida po MS/MS spektru	6000
Najmanji broj aminokiselina u redu	4
Najbolja podudarnost prvih vrsta	10
Pregled prema	svim biljkama

Tablica 17. Prikaz parametara pretrage za *de novo* sekvenciranje

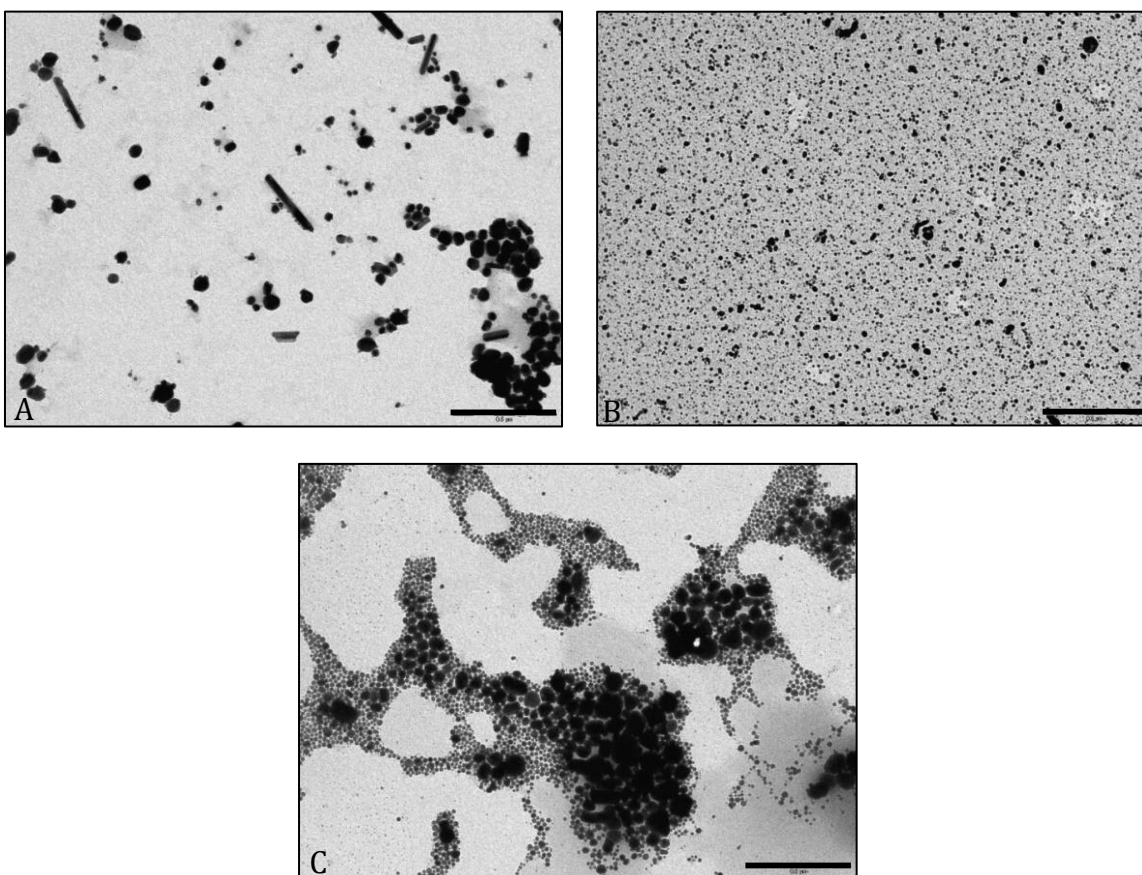
BROJ GRANANJA ZA ALGORITAM SIDRA		BROJ OSTVARENIH UPITA	
% odbačenih rezultata u spektru	1	Algoritam sidra (negativ i pozitiv)	4
Probrani najintenzivniji pikovi	300	Algoritam čitanja desno-lijevo (negativ)	5
Duljina sidra (aminokiseline)	3	Algoritam sidra (pozitiv)	4
Broj mogućih grananja unutar spektra	5	Postavka aminokiselina koje: - oduzimaju vodu: serin(S) i treonin (T) - primaju vodu: arginin (R) i lizin (K) - oduzimaju vodu: arginin (R) i lizin(K)	Uključeno
		Minimalna duljina upita (aminokiseline)	4
PARAMETRI ZA PRETRAŽIVANJE BAZE PODATAKA		PRETRAŽIVANJE PREMA VRSTI	
Tolerancija pogreške u masi peptida po MS/MS spektru	0,3	Odabrani organizam	Npr. <i>Vitis vinifera</i> (vinova loza)
Tolerancija pogreške u masi peptida za arginin i lizin po MS/MS spektru	0,8		

4. REZULTATI

4.1. Morfologija i ultrastruktura

4.1.1. Nanočestice srebra i njihovi omotači

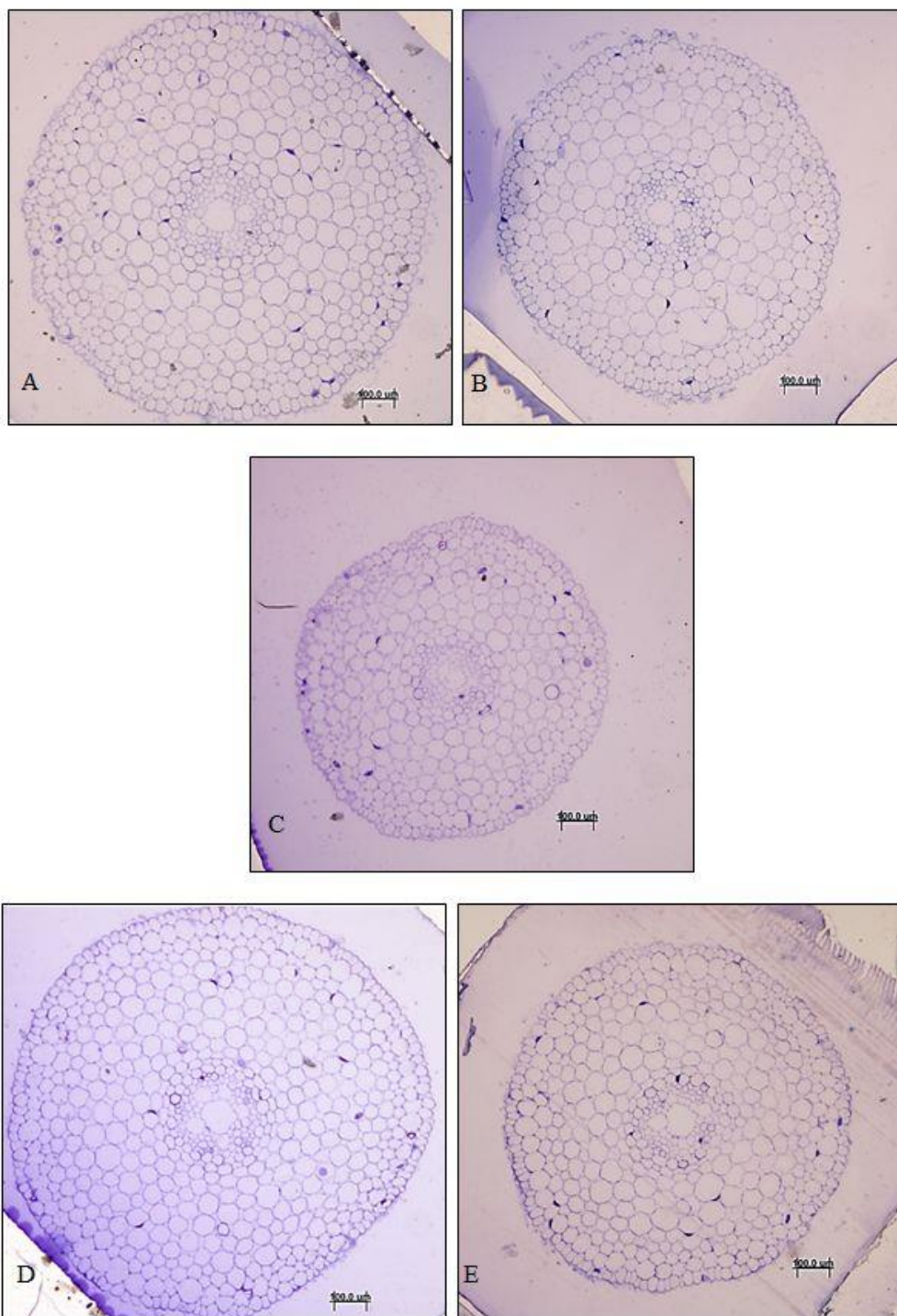
Slika 1 prikazuje matične otopine nanočestica srebra obavijene trima različitim omotačima. Na slikama je vidljivo kako su one vrlo raznolike i po veličini i po obliku. Nanočestice obavijene CTAB-om okruglog su oblika, jako velike (oko 100 nm) ili vrlo sitne (oko 30 nm). Nadalje, AgNP-citrat su okruglog (oko 60 nm), ali i štapićastog oblika dok su AgNP-PVP najmanje (oko 10-20 nm) i pretežito okruglog oblika, ali se mogu pronaći i poneke u obliku ljuskica. Razlika u veličini AgNP potječe iz načina njihove sinteze.



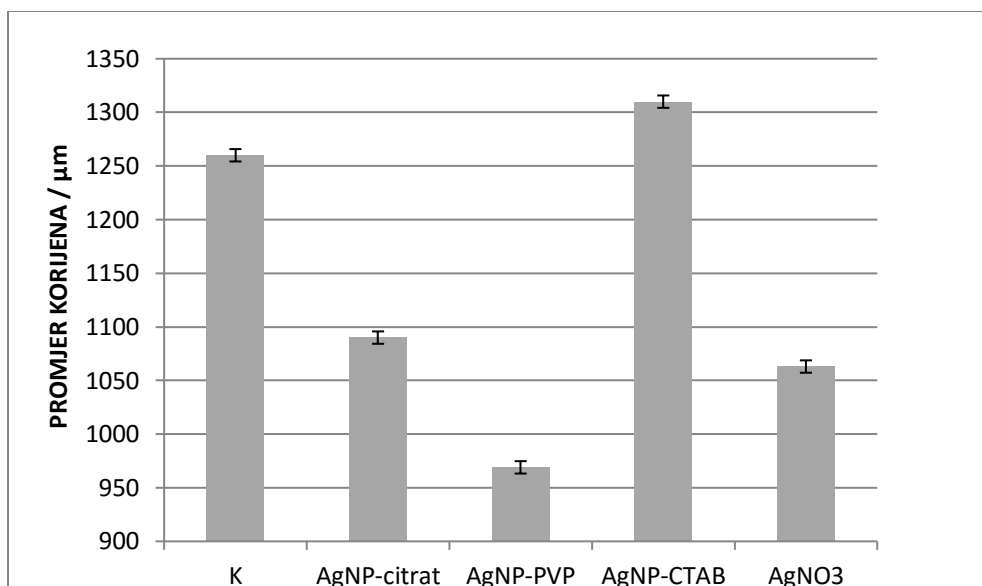
Slika 1. Nanočestice srebra stabilizirane različitim vrstama omotača: A) negativno nabijenim citratnim anionom (AgNP-citrat), B) slabo negativno nabijenim polivinilpirolidonom (PVP; AgNP-PVP) i C) pozitivno nabijenim cetiltrimetilamonijevim kationom (CTAB; AgNP-CTAB). Fotografije su snimljene transmisijским elektronskim mikroskopom. Skala = 0,5 μm .

4.1.2. Strukturne promjene u tkivu korijena luka utvrđene svjetlosnim mikroskopom

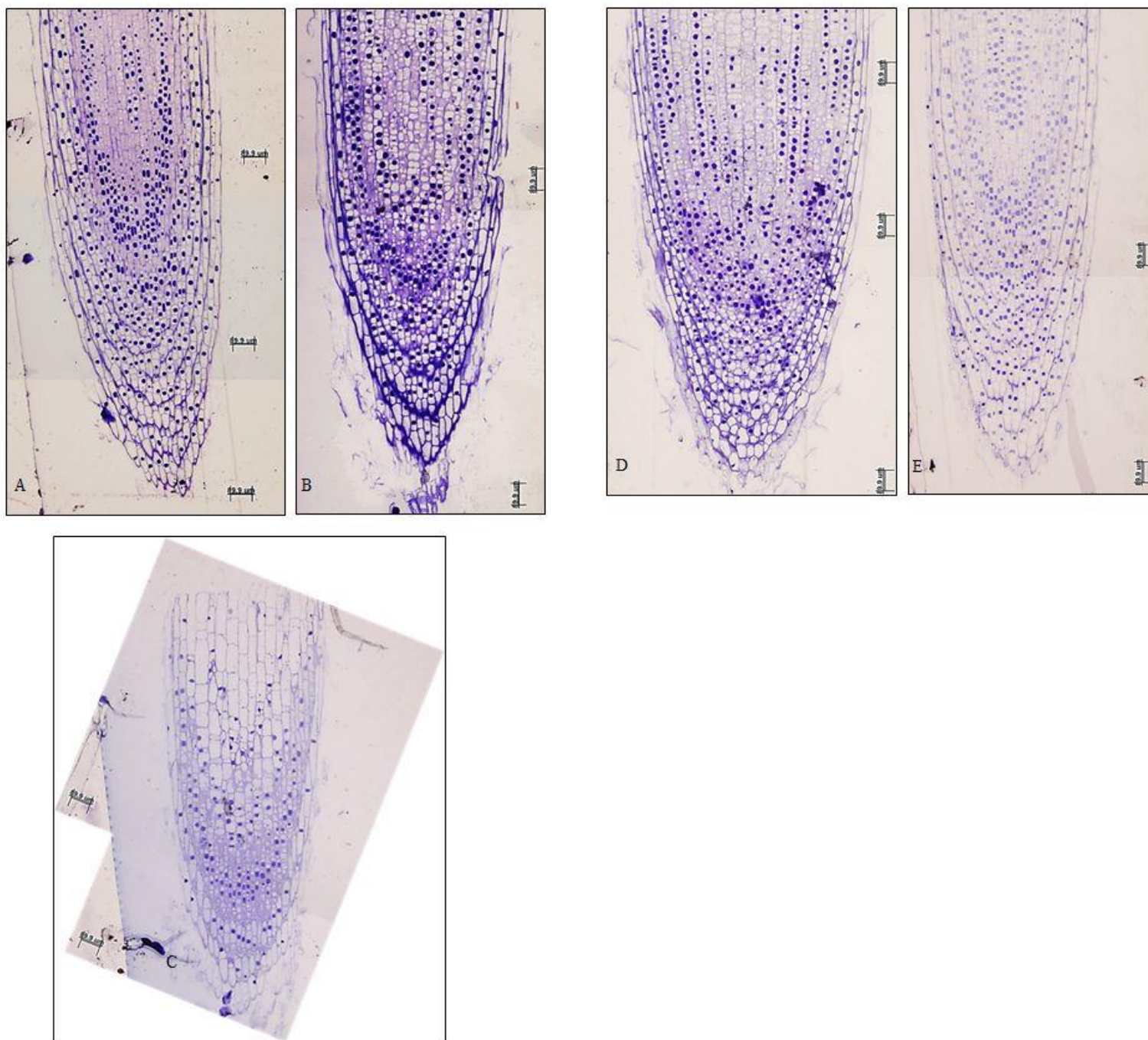
Na slici 2 nalaze se poprečni, a na slici 4 uzdužni poludebeli prerezi različito tretiranih korijena luka. Na njima se ne uočava promjena strukture nakon 72 h izlaganja tretmanima s različito stabiliziranim nanočesticama i ionima srebra. Međutim, kako se može iščitati iz slike 3, korijeni se razlikuju prema veličini, odnosno debljini. Korijen luka koji je rastao u otopini s AgNP-CTAB ima najveći promjer, slijede ga kontrolni korijen, korijen iz tretmana s AgNP-citrat pa korijen iz otopine AgNO₃, dok najmanji promjer ima korijen tretiran s AgNP-PVP.



Slika 2. Svjetlosno-mikroskopske slike poprečnih poludebelih prereza korijena luka nakon 72 h rasta u A) vodi (kontrola), tretmanu s nanočesticama srebra s omotačem od B) citratnih aniona (AgNP-citrat), C) polivinilpirolidona (AgNP-PVP), D) cetiltrimetilamonijevih kationa (AgNP-CTAB) i E) ionskom srebru (AgNO₃). Skala = 100 μm



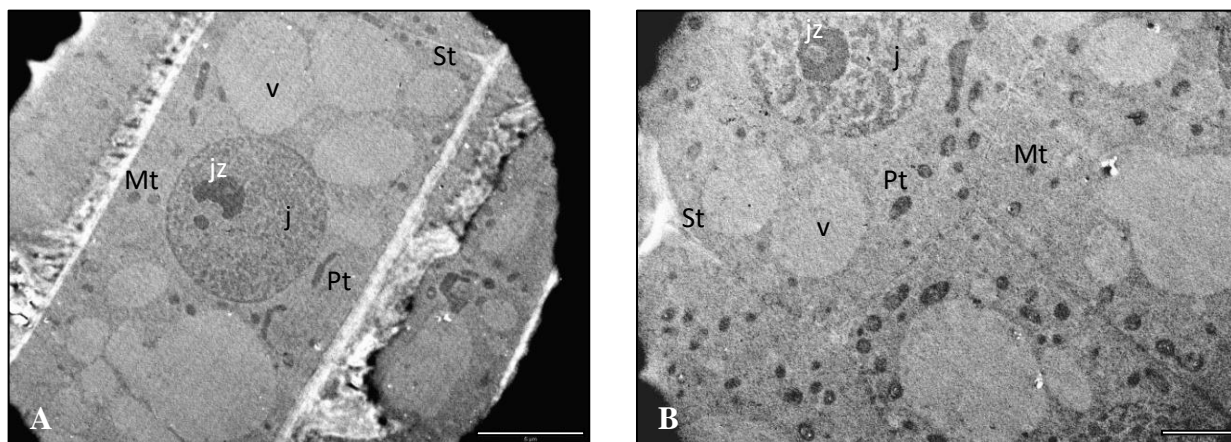
Slika 3. Debljine, tj. promjeri (u μm) korijena luka nakon 72 h rasta u vodi (kontrola), tretmanu s nanočesticama srebra s omotačem od citratnih aniona (AgNP-citrat), polivinilpirolidona (AgNP-PVP) i cetiltrimetilamonijevih kationa (AgNP-CTAB) te u ionskom srebru (AgNO₃). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna pogreška.



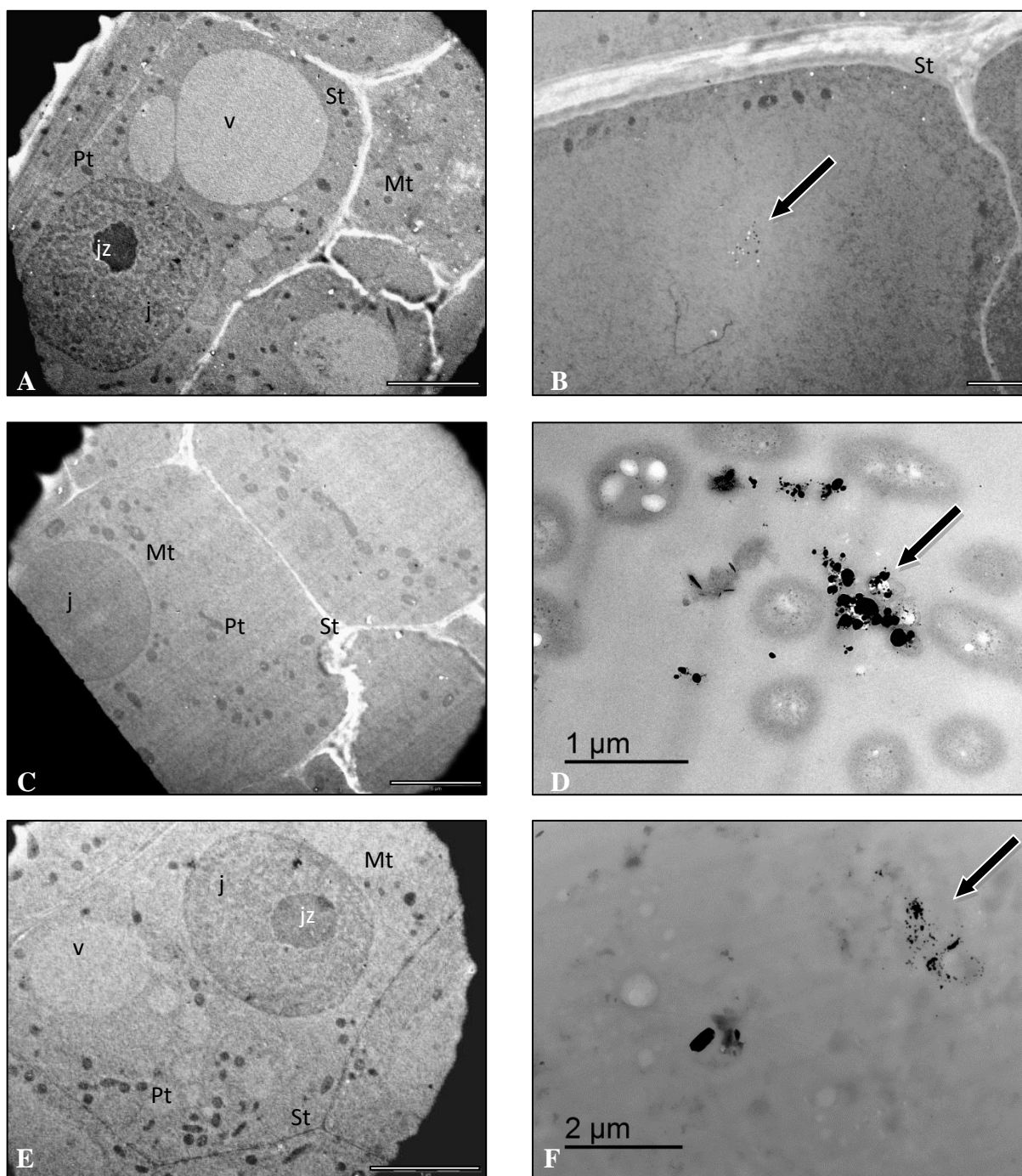
Slika 4. Svjetlosno-mikroskopske slike uzdužnih poludebelih prereza korijena luka nakon 72 h rasta u A) vodi (kontrola), tretmanu s nanočesticama srebra s omotačem od B) citratnih aniona (AgNP-citrat), C) polivinilpirolidona (AgNP-PVP), D) cetiltrimetilamonijevih kationa (AgNP-CTAB) i E) ionskom srebru (AgNO₃). Svaka slika sastavljena je od 2 ili 3 zasebne snimke istog uzorka. Skala = 89,9 μm

4.1.3. Strukturne promjene u tkivu korijena luka utvrđene elektronskim mikroskopom

Elektronsko-mikroskopske slike ultratankih prereza različito tretiranih korijena luka prikazani su na slikama 5 i 6. Na njima se može razlikovati više staničnih struktura (jezgra, jezgrica, vakuole, mitohondriji, plastidi, stanična stijenka) nego što je to moguće svjetlosnim mikroskopom (jezgra, stanična stijenka). Također, kao ni na poludebelima, tako ni na ultratankim prerezima ne uočavam neke značajne morfološke promjene u ultrastrukturi stanica i organela tijekom 72 h izlaganja tretmanima s različito stabiliziranim nanočesticama i ionima srebra. Međutim, na slikama 6B, 6D i 6F vidi se kako su nanočestice srebra, stabilizirane odgovarajućim omotačima ovisno o otopini u kojoj su korijeni rasli, ušle u stanice korijena luka i u njima se akumulirale.



Slika 5. Elektronsko-mikroskopske slike ultratankih prereza korijena luka nakon 72 h rasta u A) vodi (kontrola) i B) ionskom srebru (AgNO_3); j – jezgra, jz – jezgrica, v - vakuole, Mt – mitohondriji, Pt – plastidi, St - stanična stijenka. Skala = 2 μm

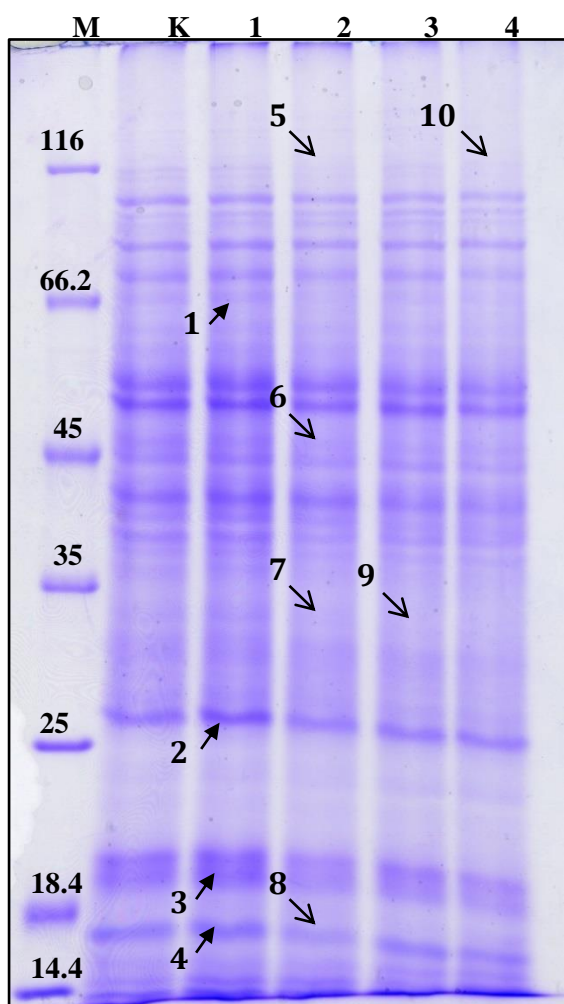


Slika 6. Elektronsko-mikroskopske slike ultratankih prereza korijena luka nakon 72 h rasta u tretmanu s nanočesticama srebra s omotačem od A) citratnih aniona (AgNP-citrat), C) polivinilpirolidona (AgNP-PVP) i E) cetiltrimetilamonijevih kationa (AgNP-CTAB); j – jezgra, jz – jezgrica, v - vakuole, Mt – mitohondriji, Pt – plastidi, St - stanična stijenka. Skala = 5 μm . Akumulirane nanočestice srebra (strelice) unutar stanica korijena luka: B) AgNP-citrat; skala = 2 μm , D) AgNP-PVP; skala = 1 μm i F) AgNP-CTAB; skala = 2 μm .

4.2. Razdvajanje, vizualizacija i identifikacija proteina

4. 2.1. 1D-profil ukupnih topivih proteina u tkivu korijena luka

Na slici 7 prikazan je proteinski profil ukupnih topivih proteina u korijenima luka koji su rasli u vodi (K) te u otopinama s nanočesticama i ionima srebra (1-4), razdvojeni 1-D SDS-PAG elektroforezom. U usporedbi s kontrolom i ostalim tretmanima, tkivo korijena luka tretirano 72 h s AgNP-citratom pokazuje najveće razlike u povećanoj ekspresiji proteina, od čega se posebno ističu vrpce od oko 66,2 kDa, 27 kDa, 20 kDa, 17 kDa (vrpce 1-4), a tkivo tretirano s AgNP-PVP najveće razlike u smanjenoj ekspresiji proteina, od čega se posebno ističu vrpce oko 116 kDa, 46 kDa, 33 kDa i 17 kDa (vrpce 5-8). Nadalje, može se uočiti i smanjena ekspresija za proteinske vrpce od oko 33 kDa u tretmanu AgNP-CTAB (vrpca 9) i od oko 116 kDa u tretmanu sa srebrovim nitratom (vrpca 10).



Slika 7. Proteinski profil ukupnih topivih proteina korijena luka koji su rasli u vodi i otopinama s AgNP i AgNO₃ nakon 1-D SDS-PAG elektroforeze. Gel je obojan bojom CBB.

M – biljezi molekulskih masa (kDa),

K – kontrola,

1 – AgNP-citrat,

2 – AgNP-PVP,

3 – AgNP-CTAB,

4 – AgNO₃

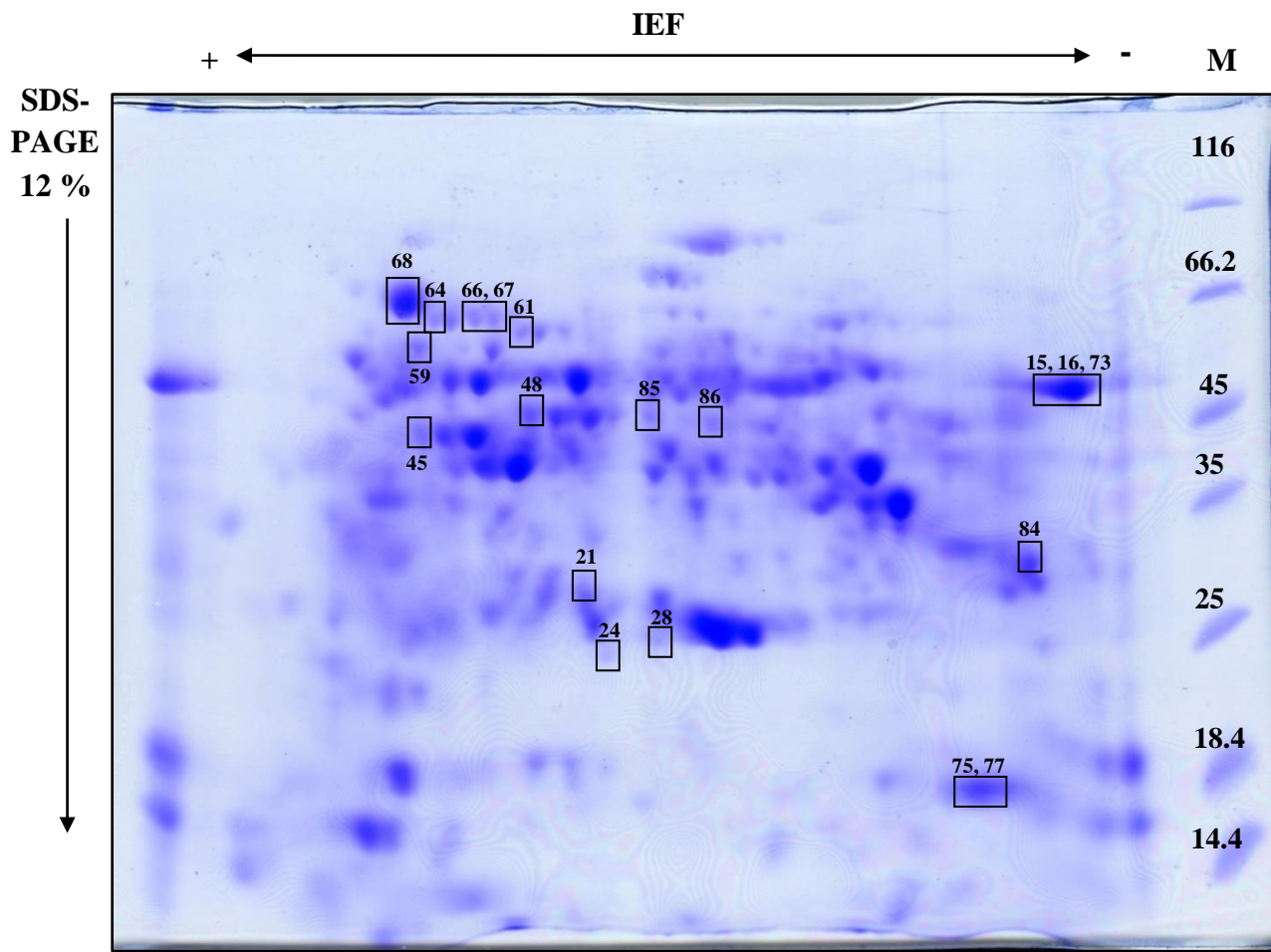
Objašnjenje simbola:

↗ povećana ekspresija proteinskih vrpca,

↘ smanjena ekspresija proteinskih vrpca

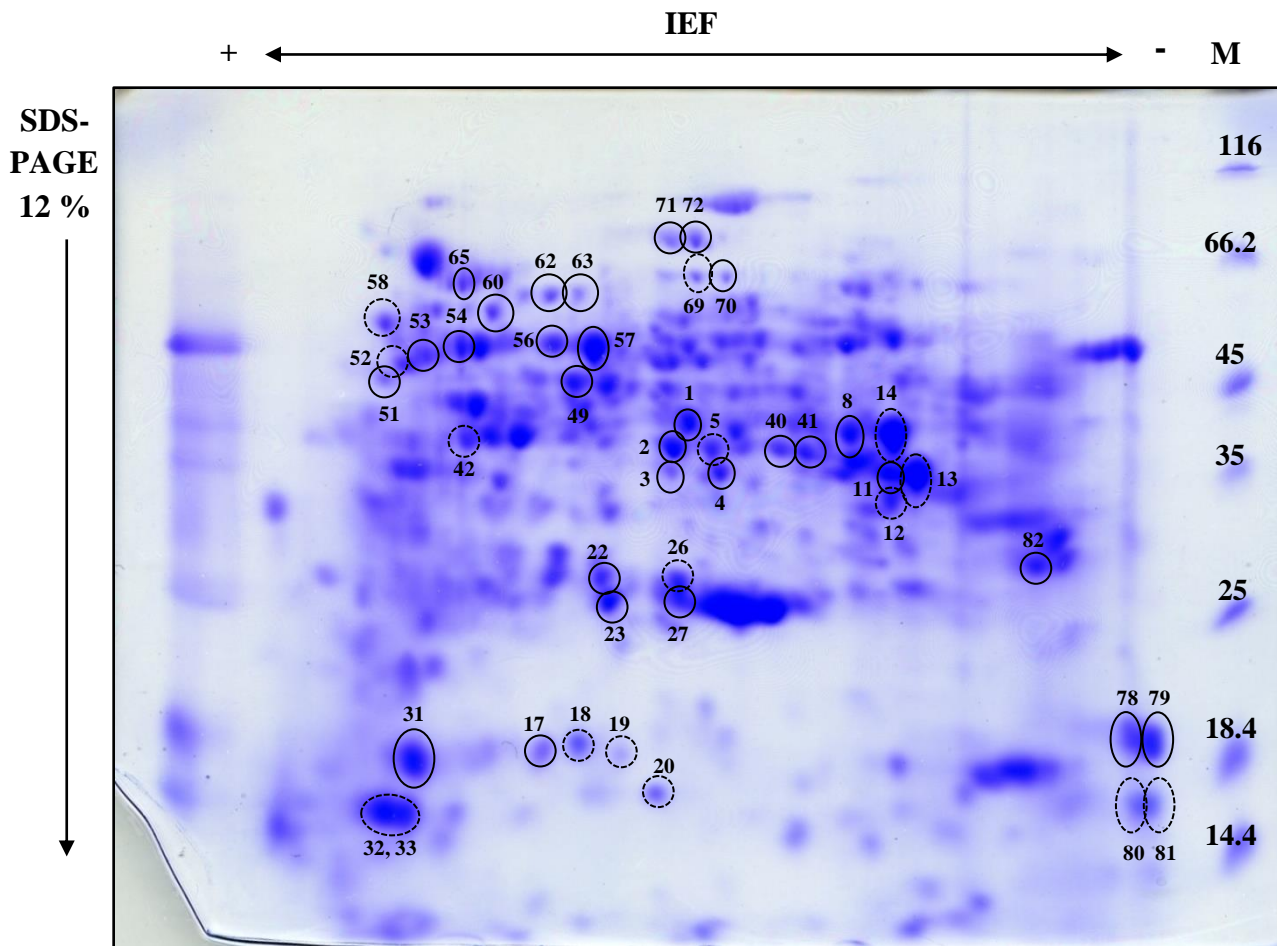
4.2.2. 2-D profil i razlikovna ekspresija ukupnih topivih proteina u tkivu korijena luka

Na gelovima koji su dobiveni 2-D elektroforezom (prva dimenzija – IEF, druga dimenzija – SDS-PAGE) uspoređivala sam ekspresijske profile proteinskih mrlja, vizualizirane bojom CBB, kako bih pronašla različito eksprimirane proteinske biljege za kasniju analizu spektrometrijom masa. Rezultati kvantitativne obrade 2-D gelova računalnim programom Image Master 2D Platinum prikazani su na slikama 8-12. Od ukupno 74 izrezane proteinske mrlje 20 ih je podjednako eksprimirano u kontroli (slika 8) i svim tretmanima. U usporedbi s kontrolom, najviše proteinskih mrlja s pojačanom ekspresijom, njih 45, nalazi se u tkivu korijena luka tretiranom s AgNP-citrat (slika 9 i tablica 18), a najmanje s AgNP-PVP, njih 23 (slika 10 i tablica 18). Istovremeno, broj proteinskih mrlja sa smanjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu najveći je u tkivu tretiranom s AgNP-PVP, njih 12 (slika 10 i tablica 18), dok nijedna proteinska mrlja u korijenu luka koji je rastao u otopini s AgNP-citrat ne pokazuje smanjenu ekspresiju. U korijenu luka koji je rastao u otopini s AgNP-CTAB pojačanu ekspresiju imaju 32 proteinske mrlje, a njih 4 pokazuje smanjenu ekspresiju (slika 11 i tablica 18). U korijenu luka koji je rastao u otopini s AgNO₃ pojačanu ekspresiju pokazuje 34 proteinske mrlje, a njih 10 smanjenu ekspresiju (slika 12 i tablica 18). Sažeti prikaz rezultata razlikovne analize proteinskih mrlja kontrole i pojedinog tretmana nalazi se u Tablici 18, a slike 8-12 prikazuju proteinske profile tkiva korijena luka tretiranih nanočesticama te označene proteinske mrlje s povećanom odnosno smanjenom razlikovnom ekspresijom u odnosu na kontrolu.



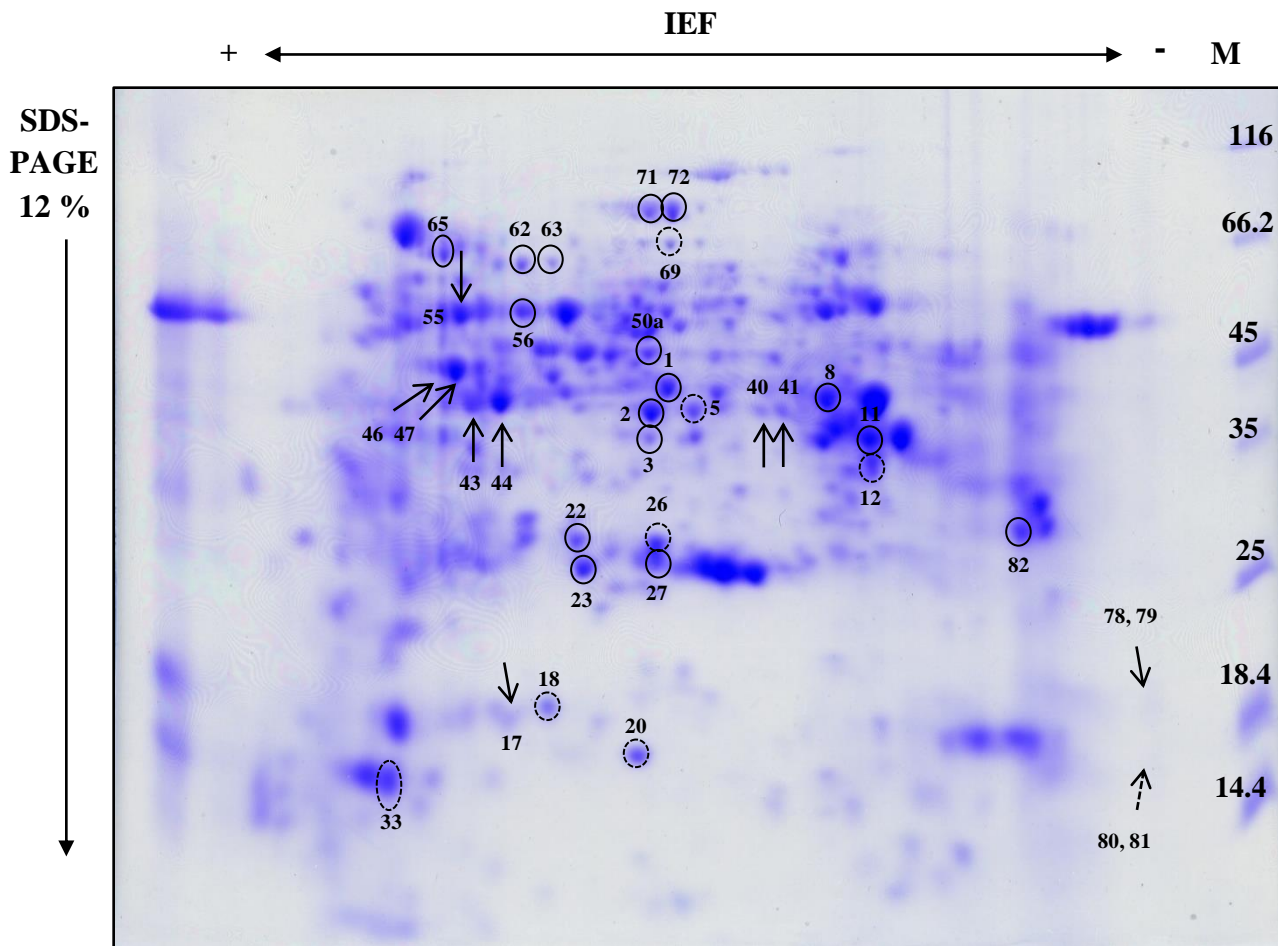
Slika 8. Ukupni topivi proteini korijena luka koji je rastao u vodi (kontrola) razdvojeni 2-D-SDS-PAGE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost nj. izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase; objašnjenje simbola:

□ - podjednako eksprimirani proteini u kontroli i svim tretmanima



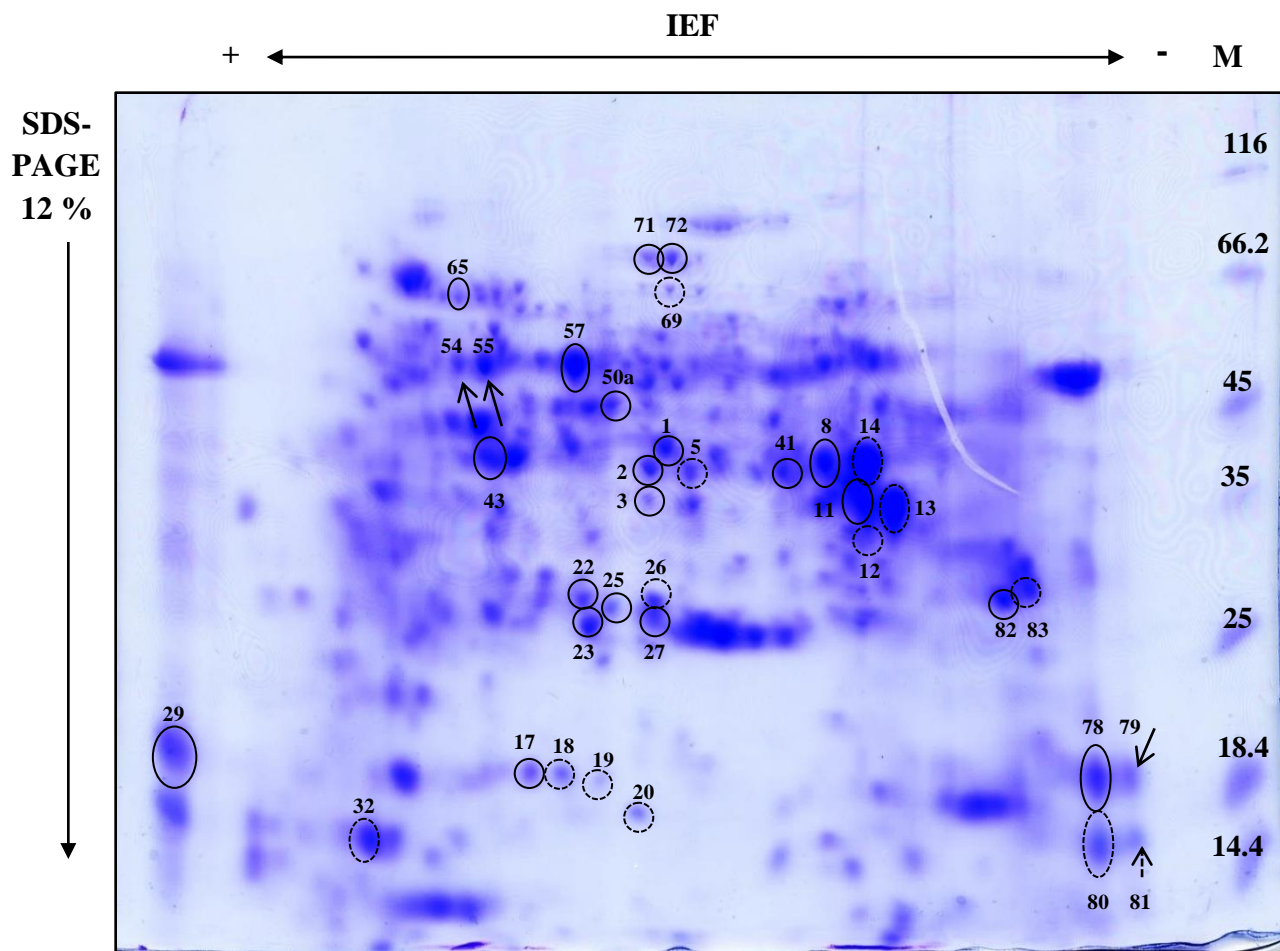
Slika 9. Ukupni topivi proteini korijena luka tretiranog s AgNP-citratom razdvojeni 2-D-SDS-PAGE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost nj. izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase; objašnjenje simbola:

- - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ∴ - povećana ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu



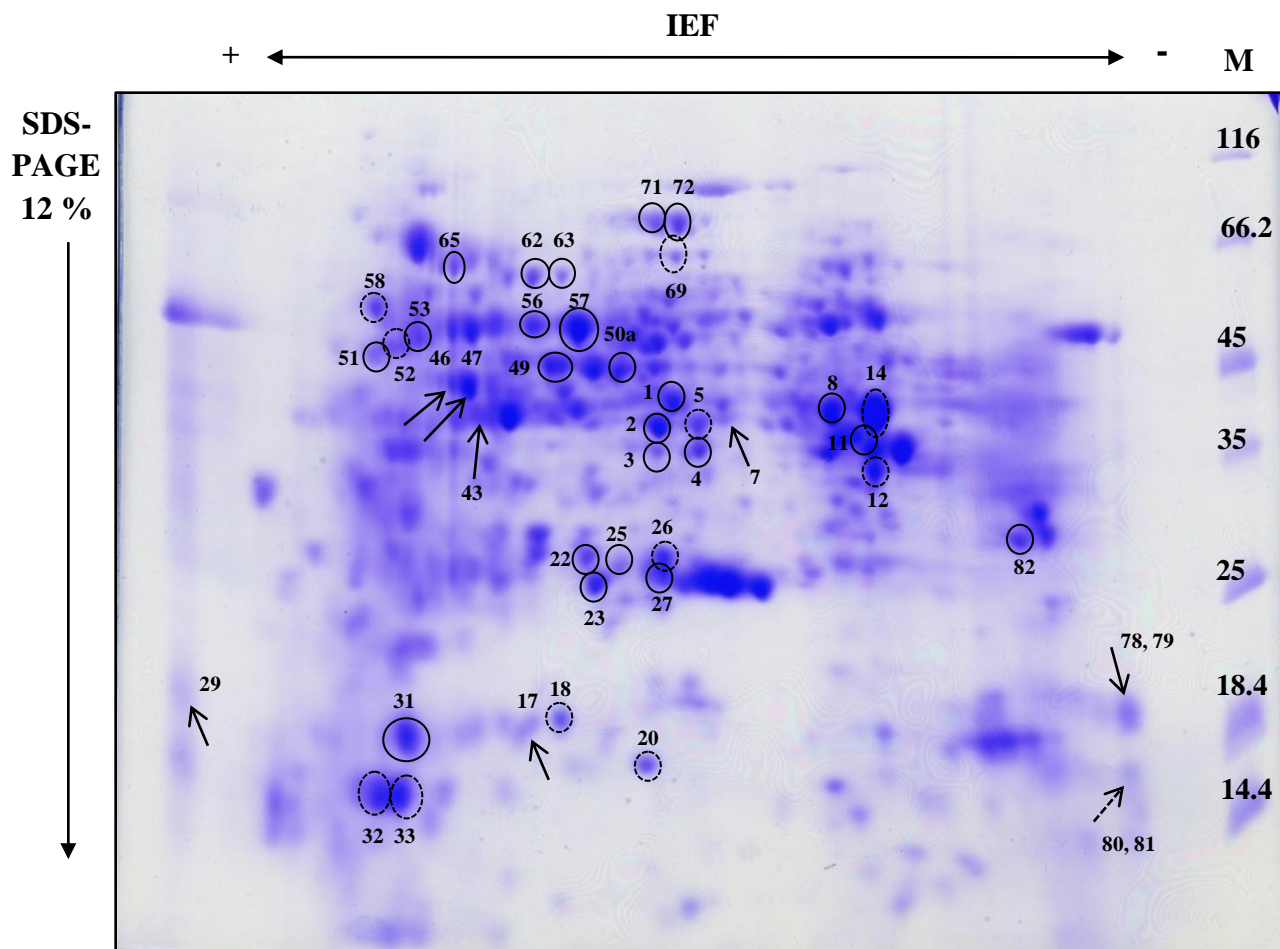
Slika 10. Ukupni topivi proteini korijena luka tretiranog s AgNP-PVP razdvojeni 2-D-SDS-PAGE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost nj. izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase; objašnjenje simbola:

- - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ⊖ - povećana ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ↑ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ⋈ - smanjena ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu



Slika 11. Ukupni topivi proteini korijena luka tretiranog s AgNP-CTAB razdvojeni 2-D-SDS-PAGE Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost nj. izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase; objašnjenje simbola:

- - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ⊖ - povećana ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ↑ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ⬆ - smanjena ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu,



Slika 12. Ukupni topivi proteini korijena luka tretiranog s AgNO_3 razdvojeni 2-D-SDS-PAGE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom Image Master 2D Platinum. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost nj. izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase; objašnjenje simbola:

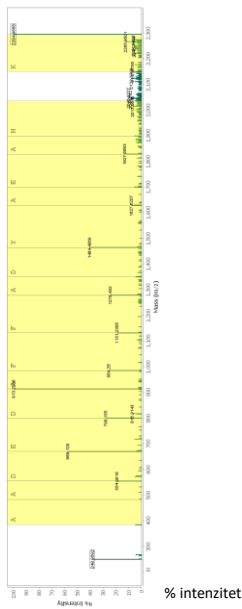
- - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ⊖ - povećana ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ↑ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,
- ⬆ - smanjena ekspresija neidentificiranih proteina u odnosu na kontrolu

Tablica 18. Prikaz rezultata razlikovne analize proteinskih profila kontrolnog te nanočesticama i ionima srebra tretiranih tkiva korijena luka; ID – broj identificiranih proteina, nID – broj neidentificiranih proteina

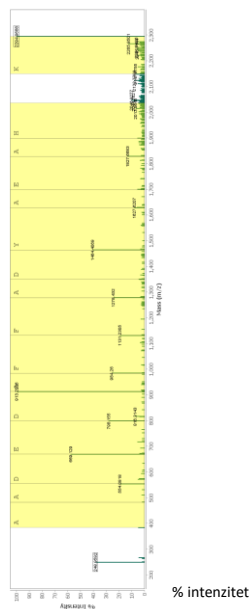
USPOREDBA kontrola (K) - tretman	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA				NEMA PROMJENE
	pojačana ekspresija		smanjena ekspresija		
	ID	nID	ID	nID	
K – AgNP-citrat	29	16	0	0	29
K – AgNP-PVP	16	7	10	2	39
K – AgNP-CTAB	20	12	3	1	38
K – AgNO ₃	23	11	8	2	30

4.2.3. Identifikacija proteina spektrometrijom masa

Izabrani proteini analizirani su spektrometrom masa. Svakom od 74 proteina snimljen je spektar MS, nakon čega je po 10 peptida s najjačim intenzitetom podvrgnuto dodatnoj fragmentaciji i snimanju spektra MS/MS (primjer pozitivnog i negativnog MS/MS spektra nalaze se na slici 13). Iz tako dobivenih spektara očitane su aminokiselinske sekvence. Kako vrsta *Allium cepa* još nije sekvencirana proteini su pronađeni usporedbom s deset biljnih vrsta s kojima je luk pokazao najveću homologiju prema ukupnoj NCBI nr/Plants bazi podataka. Od 74 izoliranih proteinskih mrlja izrezanih iz gela identificirano je (tj. pronađeni su homologni proteini u drugim biljnim vrstama) 50 proteina *de novo* iščitavanjem peptidnih sekvenci. U *de novo* čitanju, očitane su i aminokiseline koje ne odgovaraju bazi podataka. Tu su greške nešto veće nego u sravnavanju aminokiselinskog slijeda s onima u bazi podataka (slika 13), no tek preklapanja i jedne i druge metodologije donosi konačnu potvrdu peptida (slika 14). Popis identificiranih proteina s pripadajućim identifikacijskim brojevima, masama, PI vrijednostima i informacijom o vrstama u kojima su nađeni nalazi se u tablici 19. U tablici 20 navedena je njihova razlikovna ekspresija, tj. način na koji je ekspresija tih proteina promijenjena u usporedbi s kontrolom, te su dana dodatna pojašnjenja o molekularnim funkcijama koje ti proteini obavljaju u stanici, zajedno s njihovim biološkim kategorijama i staničnim komponentama u kojima se nalaze.



masa (m/z)



masa (m/z)

Slika 13. Prikaz MS/MS (m/z) spektra u negativnom (A) i pozitivnom (B) obliku iona (b-serija iona u negativnom MS/MS, smjer čitanja od N- prema C- kraju; y-serija iona (nema CAF reagens na N-kraju) u pozitivnom MS/MS, smjer čitanja od C- prema N- kraju) za 2294.9688 peptidni fragment, snimljen s pozicije A19 MALDI pločice (proteinska mrlja 22 – askorbat peroksidaza Gl: 559005, *Nicotiana tabacum*). Pozitivni MS/MS spektar (B) prikazuje masu peptida (m/z) od 2046.9087 i to predstavlja teorijsku masu; izmjerena malo griješi i ona je 2049.0243 kao što je vidljivo u spektru

A

Bod	Očekivano	Identično	Negativ	Pukotine
43.1	9.0E-8	13/13 (100.0%)	13 /13 (100.0%)	0 /13

Algoritam-upit YAADEDAFFADYAK

Sekvenca dijela proteina RPLVEKYAADEDAFFADYAEHLKL 224..236

B

Bod	Očekivano	Identično	Pozitiv	Pukotine
26.1	0.018	8/8 (100.0%)	8 /8 (100.0%)	0 /8

Algoritam-upit ADEDAFFAPN

Sekvenca dijela proteina PLVEKYAADEDAFFADYAEHL 226..233

Slika 14. *De novo* očitavanje za isti spektar u negativu (A) i pozitivu (B) za 2294.9688 peptidni fragment, snimljen s pozicije A19 MALDI pločice (proteinska mrlja 22 – askorbat peroksidaza GI: 559005, *Nicotiana tabacum*). Crvenim su označena slova koja su očitana, a ne odgovaraju bazi podataka

Tablica 19. Proteini izolirani iz tkiva korijena luka i identificirani metodom MALDI-TOF/TOF

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA	VRSTA	IDENTIFIKACIJSKI BROJ (NCBI/UNIPROT)	MASA PROTEINA (Da)	pI
1	Kloroplastna fosfoglicerat kinaza, precursor	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 2499497 / Q42961	50177	5.59
2	Plastidna aldolaza / fruktoza-bisfosfat aldolaza	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 294440432 / ADE74633	42806	6.38
	Protein s NB-ARC domenom	<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>	GI: 15486673 / Q2QZH4	128328	5.51
3	<i>Predviđen:</i> faktor regulacije rasta 3	<i>Fragaria vesca</i> <i>subsp. vesca</i>	GI: 470144528 / XP_004307906.1	58522	8.47
4	Hipotetski protein OsI_21092	<i>Oryza sativa indica</i>	GI: 125553424 / EAY99133.1	114102	8.31
7	<i>Moguć:</i> mitohondrijska malat dehidrogenaza	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 48375044 / AAT42189	22037	7.64
8	RNA-vezni protein 1 s bromodomenom	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 57282320 / CAD43286.1	67209	8.51
11	Citosolna glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza 1	<i>Zea mays</i>	GI: 120670 / P08735.2	36523	6.46
15	EF-1-alfa povezan GTP vezni protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 1009232 / AAA79032.1	57154	5.21
16	Elongacijski faktor 1-alfa (kraće: EF-1-alfa)	<i>Zea mays</i>	GI: 3122071 / Q41803.1	49233	9.19
17	T-filoplaninu sličan protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 311893249 / BAJ25794.1	14138	8.75
21	Askorbat peroksidaza	<i>Cicer arietinum</i>	GI: 4586574 / BAA76419.1	19266	4.60
	Askorbat peroksidaza 2	<i>Zea mays</i>	GI: 162457709 / NP_001105500.1	27312	5.28
22	Askorbat peroksidaza 2	<i>Zea mays</i>	GI: 162457709 / NP_001105500.1	27312	5.28
	Askorbat peroksidaza	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 559005 / AAA86689	27388	5.43
23	Citosolna trioza-fosfat izomeraza	<i>Zea mays</i>	GI: 195608720 / ACG26190.1	25062	7.72
24	<i>Vjerojatan:</i> kinon oksidoreduktaza; flavoproteinu WrbA sličan protein	<i>Cicer arietinum</i>	GI: 525313835 / NP_001266148.1	21722	6.52
25	<i>Predviđen:</i> At1g74900 protein s pentatrikopeptidnim ponavljajućim sljedovima, sličan mitohondrijskom	<i>Fragaria vesca</i> <i>subsp. vesca</i>	GI: 470130788 / XP_004301284.1	55621	9.38
27	Protein otporan na bentazon i sulfonilureju	<i>Oryza sativa indica</i>	GI: 85362955 / ABC69856.1	56612	8.36

28	<i>Predviđen:</i> superoksid dismutaza (Mn), slična mitohondrijskoj	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	GI: 470144151 / XP_004307727.1	25099	7.90
29	Histon H2B.3	<i>Zea mays</i>	GI: 3913804 / Q43261.3	16492	10.00
31	Alfa podjedinica heterotrimernog GTP veznog proteina	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 18369796 / BAB84093.1	44661	5.83
40	Malat dehidrogenaza	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 10798652 / CAC12826.1	35408	5.91
41	Malat dehidrogenaza	<i>Zea mays</i>	GI: 195628708 / ACG36184.1	35463	7.63
43 44	Glutamat-amonijak ligaza (glutamin sintetaza izoenzim korijena 1)	<i>Zea mays</i>	GI: 585201 / P38559.1	39250	5.60
45	Kloroplastna ribuloza bisfosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2 (kraće: RuBisCo aktivaza 2), prekursor	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI:12643758 / Q40565.1	48343	8.14
46	Aktin 2	<i>Zea mays</i>	GI: 226493810 / NP_001146931.1	41680	5.31
47	Aktin 1	<i>Zea mays</i>	GI: 113220 / P02582.1	41618	5.22
48	S-adenozilmetionin sintetaza 1	<i>Zea mays</i>	GI: 195645456 / ACG42196.1	43046	5.57
49	Metionin adenziltransferaza	<i>Zea mays</i>	GI: 17017259 / AAL33587.1	27632	5.14
50A	<i>Predviđen:</i> lizin specifična demetilaza REF6	<i>Zea mays</i>	GI: 670432908 / XP_008656966.1	149329	9.05
51	<i>Predviđen:</i> X2-izofoma serin/treonin protein kinaze, <i>tricornier-like</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>	GI: 721659453 / XP_003571874.2	64968	5.94
53	Tubulin alfa-3 lanac	<i>Zea mays</i>	GI: 162458676 / NP_001105440.1	49561	5.09
54	Beta podjedinica ATP sintaze, mitohondrijski prekursor	<i>Zea mays</i>	GI: 162462751 / NP_001105340.1	59103	6.01
55	ATP sintaza beta lanac	<i>Zea mays</i>	GI: 226493589 / NP_001151807.1	58979	5.90
56	Enolaza	<i>Zea mays</i>	GI: 195619804 / ACG31732.1	48131	5.59
57	Enolaza 1	<i>Zea mays</i>	GI: 162458207 / NP_001105896.1	48064	5.20
	Enolaza 2	<i>Zea mays</i>	GI: 162460735 / NP_001105371.1	48163	5.71
60	Šaperonin hsp60	<i>Zea mays</i>	GI: 22242 / CAA77645.1	61211	5.68
62	2,3-bisfosfoglicerat-neovisna fosfoglicerat mutaza	<i>Zea mays</i>	GI: 195628730 / ACG36195.1	60678	5.29
63	TPA: SAT5	<i>Zea mays</i>	GI: 414876262 / DAA53393.1	Nema podatka	Nema podatka

64	Podjedinica alfa vakuolarne proton pumpe	<i>Zea mays</i>	GI: 1352830 / P49087.1	61952	5.88
65	Vakuolarna ATP sintaza katalitička podjedinica A	<i>Zea mays</i>	GI: 195658441 / ACG48688.1	68419	5.30
66	<i>Predviđen:</i> razvojno-regulirani G-protein 2	<i>Cicer arietinum</i>	GI: 502156398 / XP_004510454.1	44602	9.01
67	<i>Predviđen:</i> xaa-Pro dipeptidaza	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	GI: 470102153 / XP_004287523.1	54384	5.49
68	Protein toplinskog šoka 70	<i>Zea mays</i>	GI: 861170 / CAA27330.1	70573	5.22
	<i>Predviđen:</i> transkripcijska podjedinica 37e vjerojatnog medijatora RNA polimeraze II	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	GI: 470133735 / XP_004302715.1	70924	5.11
70	<i>Predviđen:</i> X1-izoforma PH-interagirajućeg proteina	<i>Cicer arietinum</i>	GI: 828290534 / XP_012573320.1	194188	6.65
71	<i>Moguć:</i> protein metionin sintazne obitelji	<i>Zea mays</i>	GI: 413933559 / AFW68110.1	84453	5.73
72	Metionin sintaza	<i>Zea mays</i>	GI: 17017263 / AL33589.1	84453	5.73
73	Vitronektinu sličan adhezijski protein 1 [kraće: PVN1, (EF-1-alfa)]	<i>Nicotiana tabacum</i>	GI: 1169476 / P43643.1	49282	9.20
78	60S ribosomalni protein L12	<i>Zea mays</i>	GI: 195626686 / ACG35173.1	17749	9.06
79	60S ribosomalni protein L12	<i>Zea mays</i>	GI: 195626686 / ACG35173.1	17749	9.06
	Histon H2B.3	<i>Zea mays</i>	GI: 3913804 / Q43261.3	16492	10.00
82	<i>Predviđen:</i> NSP2 protein / GRAS transkripcijski faktor	<i>Zea mays</i>	GI: 670362883 / XP_008653941.1	59835	5.12

4.2.4. Karakterizacija identificiranih proteina

Nakon što sam identificirala proteine odnosno pronašla njihove homologe u drugim biljnim vrstama, za svaki sam u bazi podataka Uniprot pronašla njegovu molekularnu funkciju, biološku kategoriju te staničnu komponentu u kojoj protein djeluje. Popis identificiranih i kategoriziranih proteina, kao i njihova razlikovna ekspresija, nalazi se u tablici 20.

Tablica 20. Razlikovna ekspresija i objašnjenja funkcija proteina izoliranih iz tkiva korijena luka i identificiranih metodom MALDI-TOF/TOF

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UNIPROT)	MOLEKULARNA FUNKCIJA	BIOLOŠKA KATEGORIJA	STANIČNA KOMPONENTA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
1	Kloroplastna fosfoglicerat kinaza, prekursor GI: 2499497 /Q42961	<i>Katalizira fosforilaciju 3-fosfoglicerata stvarajući 1,3-bisfosfoglicerat i ADP kao dio reakcija koje obnavljaju ribuloza-1,5-bisfosfat. (kinaza, transferaza)</i>	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus - biosinteza ugljikohidrata)	Kloroplast, Plastid	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
2	Plastidna aldolaza / fruktoza-bisfosfat aldolaza GI: 294440432 /ADE74633	<i>Uključen je u 4. korak puta sinteze D-gliceraldehid-3- fosfata i gliceron fosfata iz D-glukoze.</i>	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza – razlaganje ugljikohidrata)	Citoplazma	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
	Protein s NB-ARC domenom GI: 15486673 /Q2QZH4	<i>Selektivna i nekovalantna interakcija s ADP, tj. adenozin 5'-difosfatom; u biljkama NB-ARC domenu (signalni motiv) imaju proteini otporni na bolesti.</i>	Zaraza i obrana	Nema podataka.	
3	<i>Predviđen:</i> faktor regulacije rasta 3 GI: 470144528 /XP_004307906.1	<i>Transkripcijski aktivator koji je uključen u regulaciju ekspanzije stanice u tkivu lista i kotiledona. Sudjeluje kao regulator razvoja u reprogramiranju stanica korijena tijekom infekcije nematodama.</i>	Regulacija i transkripcija	Jezgra	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
4	Hipotetski protein OsL_21092 GI: 125553424 /EAY99133.1	<i>Veže nukleinske kiseline i cinkove ione.</i>	Nema podataka.	Nema podataka.	AgNP-citrat ↑ AgNO ₃ ↑
7	<i>Moguć:</i> mitohondrijska malat dehidrogenaza GI: 48375044 /AAT42189	<i>Enzim koji reverzibilno katalizira oksidaciju malata u oksaloacetat redukcijom NAD⁺ u NADH. (oksidoreduktaza)</i>	Aerobno stanično disanje (ciklus trikarboksilne kiseline)	Mitohondrij	AgNO ₃ ↓
8	RNA-vezni protein 1 s bromodomenom GI: 57282320 /CAD43286.1	<i>Protein koji veže dvolančanu ili jednolančanu RNA i koji ima brom domenu koja prepoznaje acetilirane lizinske ostatke kao što su one na N-krajevima histona. Biljni protein s brom domenom specifično vežu RNA viroida.</i>	Zaraza i obrana	Nema podataka.	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
11	Citosolna gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza 1 GI: 120670 /P08735.2	<i>Ključni enzim u glikolizi koji katalizira prvi korak zamjene D-gliceraldehid 3-fosfata u 3-fosfo-D-glicerol fosfat. Esencijalan je za održavanje razine ATPa u stanici i za metabolizam ugljikohidrata. (oksidoreduktaza)</i>	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑

15	EF-1-alfa povezan GTP vezni protein GI: 1009232 /AAA79032.1	GTPazna aktivnost i vezanje GTPa, tj. gvanozin trifosfata.	Biosinteza proteina	Citoplazma	Podjednaka ekspresija.
16	Elongacijski faktor 1-alfa GI: 3122071 /Q41803.1	Promovira GTP-ovisno vezanje aminoacil-tRNA na A mjesto ribosoma tijekom biosinteze proteina. (elongacijski faktor)	Biosinteza proteina	Citoplazma	Podjednaka ekspresija.
17	T-filoplaninu sličan protein GI: 311893249 /BAJ25794.1	Inhibira razvoj spora patogenih gljivica i infekciju lista.	Zaraza i obrana	Izvan-stanična regija	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↓ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↓
21	Askorbat peroksidaza GI: 4586574 /BAA76419.1	Enzim iz skupine peroksidaza čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida, organskih hidropersoksida te lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju stanične komponente i uzrokuju stanična oštećenja. Taj enzim ima glavnu ulogu u pretvaranju ROS u manje reaktivne oblike te ima visoki afinitet za vodikov peroksid. (oksidoreduktaza, peroksidaza)	Odgovor na stres	Različite APX izoforme u: kloroplasti, mitohondriji, peroksisomi	Podjednaka ekspresija.
	Askorbat peroksidaza 2 GI: 162457709 /NP_001105500.1			Citosol	
22	Askorbat peroksidaza 2 GI: 162457709 /NP_001105500.1				AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
	Askorbat peroksidaza GI: 559005 /AAA86689				
23	Citosolna trioza-fosfat izomeraza GI: 195608720 /ACG26190.1	Enzim koji katalizira reverzibilnu konverziju trioza fosfat izomera: dihidroksiaceton fosfata i D-gliceraldehid 3-fosfata. Igra važnu ulogu u glikolizi i esencijalna je za produkciju dovoljne količine energije. (izomeraza)	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citosol	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
24	Vjerojatan: kinon oksidoreduktaza; flavoproteinu WrbA sličan protein GI: 525313835 /NP_001266148.1	Enzim reducira kinon u kinol te na taj način sprečava stvaranje polukinona i kisikovih radikala. Enzim pripada grupi flavoproteina biljaka i gljivica. (oksidoreduktaza)	Odgovor na stres	Nema podataka.	Podjednaka ekspresija.
25	Predviđen: At1g74900 protein pentatrikopeptidni m ponavljajućim sljedovima, sličan mitohondrijskom GI: 470130788 /XP_004301284.1	Uključen u RNA „editing“. Potreban za trans-„splicing“ introna 1 mitohondrijskog nad1 transkripta koji kodira NDI podjedinicu NADH dehidrogenaze respiratornog lanca membrane mitohondrija.	Moguće sudjelovanje u procesiranju RNA (RNA “editing”)	Nema podataka.	AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑

27	Protein otporan na bentazon i sulfonilureju GI: 85362955 /ABC69856.1	<i>Protein CYP81A6-citokrom p450 monooksigenaza otporna na herbicide: sulfonilureju i bentazon. Biljni citokromi P450 su uključeni u razne biosintetske reakcije te ciljaju različite biomolekule. (monooksigenaza, oksidoreduktaza)</i>	Odgovor na stres (procesi vezani za sintezu masnih kis., hormona, sek. metabolita, lignina)	Membrana	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
28	<i>Predviđen: superoksid dismutaza (Mn), slična mitohondrijskoj</i> GI: 470144151 /XP_004307727.1	<i>Uništava superoksidne radikale koji se normalno stvaraju unutar stanice i koji su toksični za biološke sustave.</i>	Odgovor na stres.	Mitohondrij	Podjednaka ekspresija.
29	Histon H2B.3 GI: 3913804 /Q43261.3	<i>Histoni su alkalni proteini koji pakiraju i uređuju DNA u strukturne jedinice-nukleosome. Histoni su glavne proteinske komponente kromatina oko kojih se namata DNA. Ovi proteini imaju ulogu u regulaciji prepisivanja, popravku DNA, replikaciji DNA i stabilnosti kromosoma.</i>	Stabilnost kromosoma	Kromosomi, Jezgra	AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↓
31	Alfa podjedinica heterotrimernog GTP veznog proteina GI: 18369796 /BAB84093.1	<i>Sudjeluje u prijenosu signala unutar stanice. Alfa-G-protein je jedan od tri podjedinice heterotrimernog G-protein kompleksa koji se aktivira i disocira iz kompleksa vezanjem GTPa te na taj način dalje prenosi signale unutar stanice. Sudjeluju u kontroli rasta, staničnoj proliferaciji i obrani. Signalni put može započeti iz plazmatske membrane, Golgijevog kompleksa ili membrane jezgre.</i>	Prijenos signala	Membrana	AgNP-citrat ↑ AgNO ₃ ↑
40	Malat dehidrogenaza GI: 10798652 /CAC12826.1	<i>Enzim koji reverzibilno katalizira oksidaciju malata u oksaloacetat redukcijom NAD⁺ u NADH. (oksidoreduktaza)</i>	Aerobno stanično disanje (ciklus trikarboksilne kiseline)	Mitohondrij	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↓
41	Malat dehidrogenaza GI: 195628708 /ACG36184.1				AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↓ AgNP-CTAB ↑
43 44	Glutamat-amonijak ligaza (glutamin sintetaza izoenzim korijena) GI: 585201 /P38559.1	<i>Katalizira pretvorbu anorganskog dušika (amonijaka) u organsku formu (glutamin). (ligaza)</i>	Metabolizam dušika	Citoplazma (kortikalno tkivo korijena klijanaca i u vrškovima)	AgNP-PVP ↓ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↓ (za 43) AgNP-PVP ↓ (za 44)
45	Kloroplastna ribuloza bisfosfat karboksilaza GI:12643758 /Q40565.1	Kemo-mehanički motorni protein koji reaktivira RuBisCO.	Energija	Kloroplast, Plastid (Stroma)	Podjednaka ekspresija.

46	Aktin 2 GI: 226493810 /NP_001146931.1	<i>Citoskeletni protein uključen u endocitozu, staničnu mobilnost, diobu, pokretanje vezikula i organela, signalizaciju, uspostavljanje oblika i polarnosti stanice te međustaničnih veza.</i>	Stanična struktura	Citoplazma	AgNP-PVP ↓ AgNO ₃ ↓
47	Aktin 1 GI: 113220 /P02582.1				
48	S-adenozilmetionin sintetaza 1 GI: 195645456 /ACG42196.1	<i>Katalizira stvaranje S-adenozimetionina iz metionina i ATPa. Glavni je donor metila u reakcijama transmetilacije i posrednik je u biosintezi poliamina i fitohormona etilena. Metabolizam S-adenozilmetionina je uključen u rast biljke preko biljnih hormona rasta i u interakcije biljnih patogena. Također, uključen je u prepisivanje gena, staničnu proliferaciju i produkciju sekundarnih metabolita. (transferaza)</i>	Procesi vezani s biljnim hormonima rasta i interakcijama s biljnim patogenima.	Citoplazma	Podjednaka ekspresija. (za 48)
49	Metionin adenoziltransferaza GI: 17017259 /AAL33587.1				AgNP-citrat ↑ AgNO ₃ ↑ (za 49)
50A	<i>Predviđen:</i> lizin specifična demetilaza REF6 GI: 670432908 /XP_008656966.1	<i>Spada u grupu enzima koji miču metilnu grupu s nukleinskih kiselina, proteina (histona) i drugih molekula. Važni su u mehanizmima epigenetskih modifikacija. (metiltransferaza)</i>	Regulacija transkripcije	Jezgra	AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
51	<i>Predviđen:</i> X2-izoforna serin/treonin protein kinaze, <i>tricornet-like</i> GI: 721659453 /XP_003571874.2	<i>Enzim koji fosforilira –OH grupu serina ili treonina. (kinaza)</i>	Regulacija stanične proliferacije Stanična diferencijacija	Unutar-stanični prostor	AgNP-citrat ↑ AgNO ₃ ↑
53	Tubulin alfa-3 lanac GI: 162458676 /NP_001105440.1	<i>Sastavni dio mikrostubula. Važan za očuvanje strukture citoskeleta.</i>	Stanična struktura	Citoplazma, Citoskelet, Mikrotubul	AgNP-citrat ↑ AgNO ₃ ↑
54	Beta podjedinica ATP sintaze, mitohondrijski prekursor GI: 162462751 /NP_001105340.1	<i>ATP sintaza je važan enzim koji proizvodi energiju u obliku ATPa. Sastoji se od dvije regije Fo i F1. Podjedinica beta i alfa čine srž F1 katalitičke regije. Rotacija centralnog dijela naspram alfa i beta podjedinice koji je okružuju dovodi do hidrolize ATPa na tri razdvojena katalitička mjesta na beta podjedinici. (hidrolaza)</i>	Transport (vodika, iona) Sinteza ATPa	Mitohondriji unutarnja membrana mitohondrija	AgNP-citrat ↑ AgNP-CTAB ↓ (za 54)
55	ATP sintaza beta lanac GI: 226493589 /NP_001151807.1				AgNP-PVP ↓ AgNP-CTAB ↓ (za 55)
56	Enolaza GI: 195619804 /ACG31732.1	<i>Enolaza je fosfopiruvat hidratataza, tj. metaloenzim odgovoran za katalizu konverzije 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat tijekom glikolize. (liaza)</i>	Metabolizam ugljikohidrata (glikolitički proces)	Citoplazma	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNO ₃ ↑
57	Enolaza 1 GI: 162458207 /NP_001105896.1				AgNP-citrat ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
	Enolaza 2				

60	Šaperonin hsp60 GI: 22242 /CAA77645.1	<i>Uključen u unos proteina i slaganje makromolekula u mitohondriju. Pomaže u pravilnom smatanju unešenih proteina. Također, sprečava krivo smatanje i promovira odmatanje i odgovarajuće formiranje odmotanih polipeptida koji su nastali uslijed stresnih uvjeta u matriksu mitohondrija.</i>	Odgovor na stres	Mitohondrij	AgNP-citrat ↑
62	2,3-bisfosfoglicerat neovisna fosfoglicerat mutaza GI: 195628730 /ACG36195.1	<i>Metaloenzim koji katalizira interkonverziju 2-fosfoglicerata i 3-fosfoglicerata. Uključen je u 3. korak puta koji sintetizira piruvat iz D-gliceraldehid 3-fosfata. (izomeraza)</i>	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNO ₃ ↑
63	TPA: SAT5 GI: 414876262 /DAA53393.1	Nema podataka.	Nema podataka.	Nema podataka.	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNO ₃ ↑
64 65	Podjedinica alfa vakuolarne proton pumpe GI: 1352830 /P49087.1 Vakuolarna ATP sintaza katalitička podjedinica A GI: 195658441 /ACG48688.1	<i>Podjedinica alfa je katalitička podjedinica perifernog VI kompleksa vakuolarne ATPaze. Odgovorna je za zakiseljavanje raznih unutarstaničnih komponenta u eukariotskoj stanici. (hidrolaza)</i> <i>ATP sintaze su enzimski kompleksi vezani na membranu. To su ionski transporteri koji povezuju sintezu ATPa i/ili hidrolizu sa transportom protona preko membrane.</i>	Transport (vodika, iona)	Vakuola, vezani na membranu	Podjednaka ekspresija. (za 64) AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑ (za 65)
66	<i>Predviđen:</i> razvojno-regulirani G-protein 2 GI: 502156398 /XP_004510454.1	<i>Veže GDP i GTP. Pripada konzerviranoj obitelji GTP-vezanih proteina. Uključeni su u staničnu diobu, proliferaciju i rast.</i>	Moguća uloga šaperona ili u sklapanju ribosoma kao odgovor na stres.	Citoplazma	Podjednaka ekspresija.
67	<i>Predviđen:</i> xaa-Pro dipeptidaza GI: 470102153 / XP_004287523.1	<i>Dipeptidza koja hidrolizira dipeptide sa prolinskim ili hidrokisprolinskim ostatkom.</i>	Nema podataka.	Nema podataka.	Podjednaka ekspresija.
68	Protein toplinskog šoka 70 GI: 861170 /CAA27330.1 <i>Predviđen:</i> transkripcijska podjedinica 37e vjerojatnog medijatora RNA polimeraze II GI: 470133735 /XP_004302715.1	<i>Šaperon koji pri različitim stresnim uvjetima štiti stanicu procesiranjem nesmotanih, krivo smotanih proteina i sprečavanjem njihove agregacije. Ima ulogu u vezanju ATPa.</i> <i>Koaktivator uključen u regulaciju transkripcije gotovo svih gena koji su ovisni o RNA polimerazi II. (šaperon)</i>	Odgovor na stres Odgovor na stres, obrana, transkripcija i njena regulacija	Stroma kloroplasta ili mitohondrija Citoplazma, Jezgra	Podjednaka ekspresija.

70	<i>Predviđen:</i> X1-izoforna PH-interagirajućeg proteina GI: 828290534 /XP_012573320.1	<i>Plekstrin homologna domena (PH) sastavni je dio proteina koji su uključeni u unutarstaničnu signalizaciju ili su sastavni dijelovi citoskeleta. PH domena veže fosfatidilinozitol lipide unutar bioloških membrana te na taj način razvrstava proteine prema različitim membranama ili omogućava interakciju sa drugim komponentama puta prijenosa signala.</i>	Odgovor na stres (homologni protein iz <i>Theobroma cacao</i>)	Stanična stijenka (homologni protein iz <i>Theobroma cacao</i>)	AgNP-citrat ↑
71 72	<i>Moguć:</i> protein metionin sintazne obitelji GI: 413933559 /AFW68110.1 Metionin sintaza GI: 17017263 /AL33589.1	<i>Odgovorne za regeneraciju metionina iz homocisteina. Metionin je prekursor S-adenozilmetionina.</i>	Procesi vezani s biljnim hormonima rasta i interakcijama s biljnim patogenima.	Citoplazma	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑
73	Vitronektinu sličan adhezijski protein GI: 1169476 /P43643.1	<i>Promovira GTP-ovisno vezanje aminoacil-tRNA na A mjesto ribosoma tijekom biosinteze proteina.</i>	Biosinteza proteina	Citoplazma	Podjednaka ekspresija.
78	60S ribosomalni protein L12 GI: 195626686 /ACG35173.1	<i>Čini veliku podjedinicu ribosoma. Protein se direktno veže na 26S ribosomalnu RNA.</i>	Sinteza proteina (translacija)	Citoplazma, Ribosom	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↓ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↓
79	60S ribosomalni protein L12 GI: 195626686 /ACG35173.1 Histon H2B.3 GI: 3913804 /Q43261.3	Vidi pod 29.	Vidi pod 29.	Vidi pod 29.	AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↓ AgNP-CTAB ↓ AgNO ₃ ↓
82	<i>Predviđen:</i> NSP2 protein / GRAS transkripcijski faktor GI: 670362883 /XP_008653941.1	<i>Sudjeluje u razvoju izdanka i korijena, prijenosu signala giberelinske kiseline i fitokroma A.</i>	Biljni rast i razvoj (regulacija transkripcije)		AgNP-citrat ↑ AgNP-PVP ↑ AgNP-CTAB ↑ AgNO ₃ ↑

Opisane sam proteine sistematizirala prema njihovim biološkim procesima i tako dobila 10 kategorija (Biljni rast i razvoj, Hormoni rasta, Metabolizam ugljika, Odgovor na stres, Regulacija transkripcije, Sinteza proteina, Stabilnost kromosoma, Stanično disanje, Transport te Zaraza i obrana) unutar kojih je ekspresija barem jednog proteina promijenjena nakon svakog od tretmana, ali i 5 kategorija (Metabolizam dušika, Procesiranje RNA, Prijenos signala, Regulacija stanične proliferacije te Stanična struktura) koje nisu zajedničke svim tretmanima.

Najveći broj proteina s različitom ekspresijom u odnosu na kontrolu pronašla sam unutar kategorije Metabolizam ugljika. 5 od ukupno 8 identificiranih i u ovu skupinu svrstanih proteina imalo je povećanu ekspresiju u tkivu korijena luka nakon svih tretmana nanočesticama i ionima srebra, dok je ekspresija preostala 3 proteina u različitim tretmanima bila ili povećana ili jednaka kontroli, ali niti jedan od proteina ove grupe nije pokazao smanjenu ekspresiju. Proteine s isključivo povećanom ekspresijom (ili u nekim tretmanima ekspresijom jednako kontroli), pronašla sam i u kategorijama Odgovor na stres (4 različita proteina), Hormoni rasta (3 različita proteina), Regulacija transkripcije (2 različita proteina) te Biljni rast i razvoj (1 različiti protein).

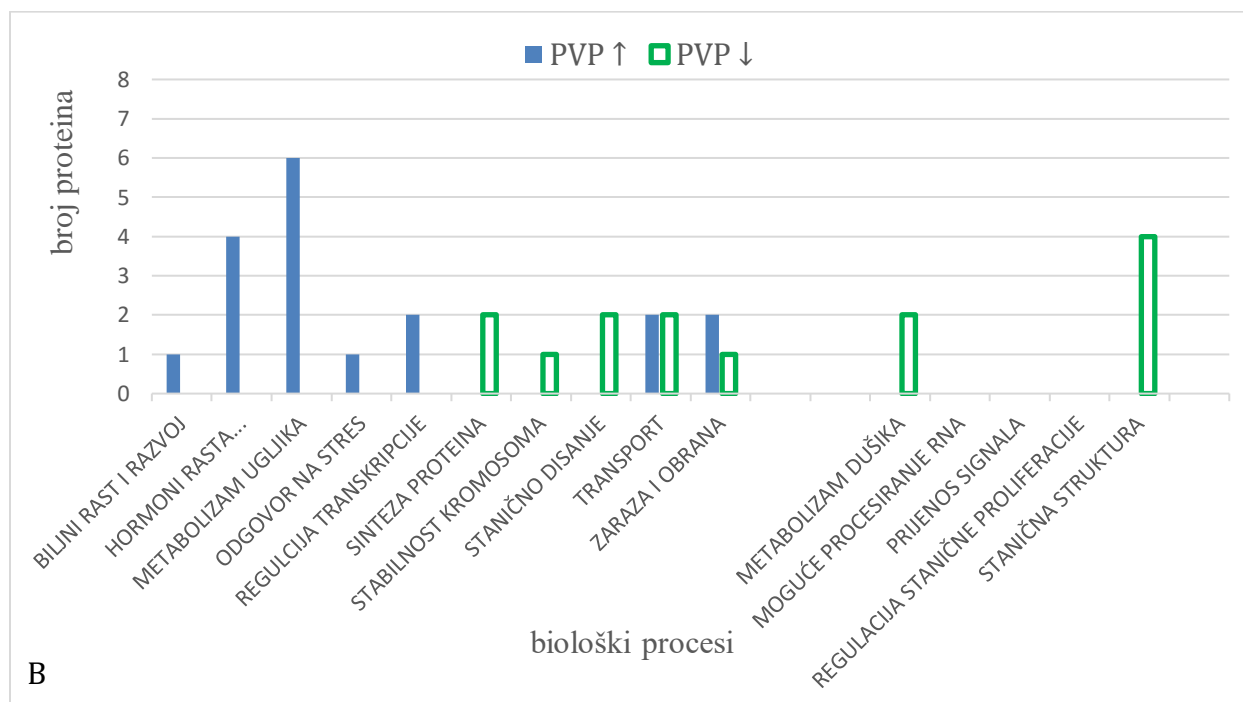
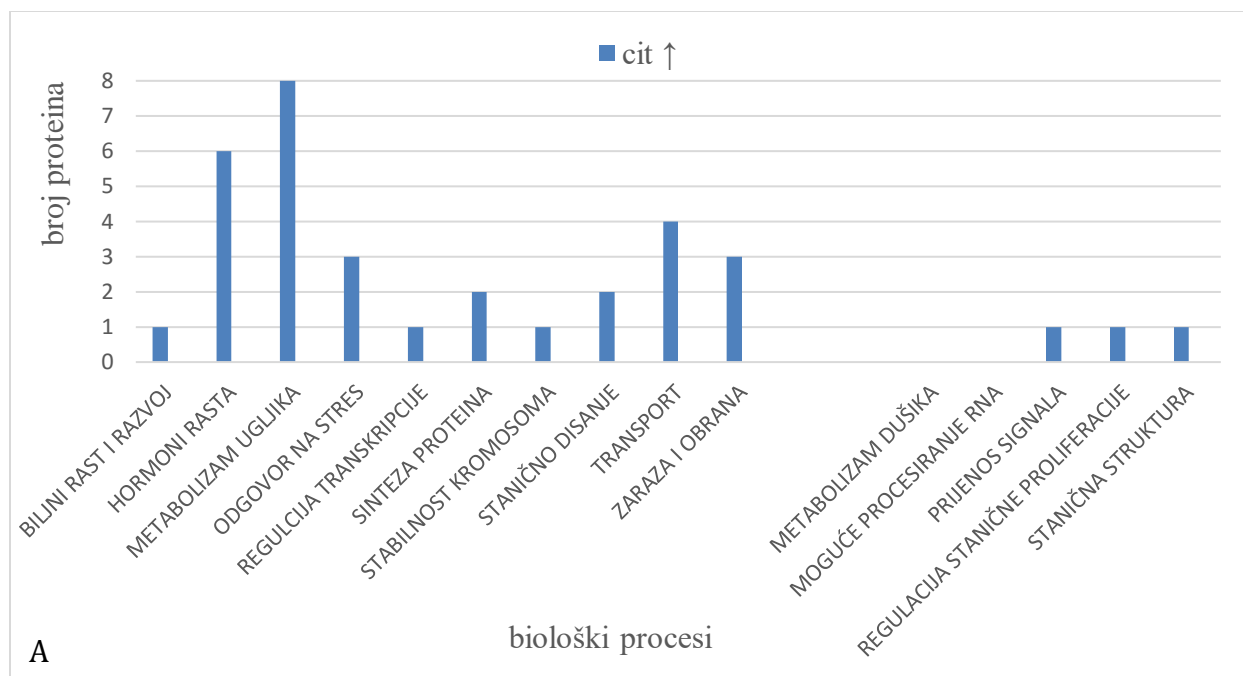
Niti jedna od 15 kategorija proteina nije sadržavala samo proteine s isključivo smanjenom ekspresijom, ali je još 5 skupina od onih zajedničkih svim tretmanima, sadržavalo proteine koji su pokazali povećanu ekspresiju za jedan tretman, a smanjenu za drugi, a to su sljedeće: Stanično disanje (3 proteina s uglavnom povećanom ekspresijom, smanjenom jedino za tretman AgNP-PVP), Transport (3 proteina s uglavnom povećanom ekspresijom, smanjenom ponajviše za tretman AgNP-CTAB), Zaraza i obrana (2 proteina s uglavnom povećanom ekspresijom), Sinteza proteina (2 proteina s različitim ekspresijama za različite tretmane) te Stabilnost kromosoma (1 protein s povećanom ekspresijom u AgNP-CTAB i smanjenom u AgNO₃).

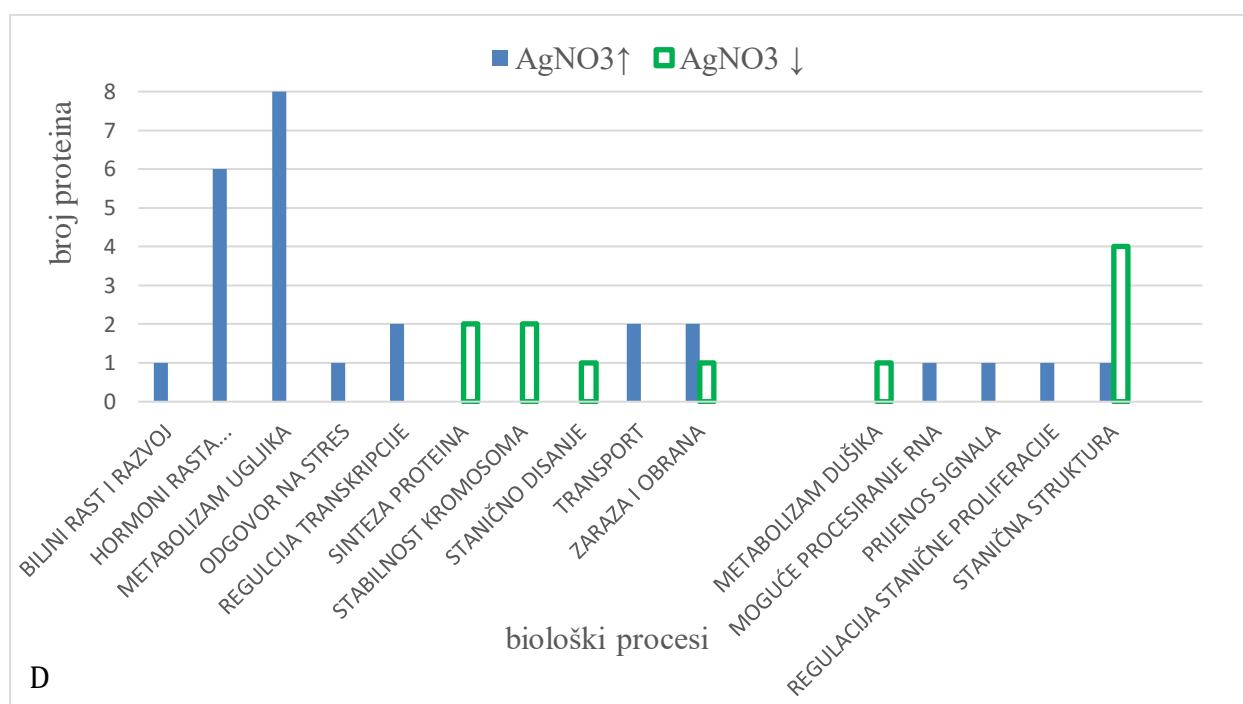
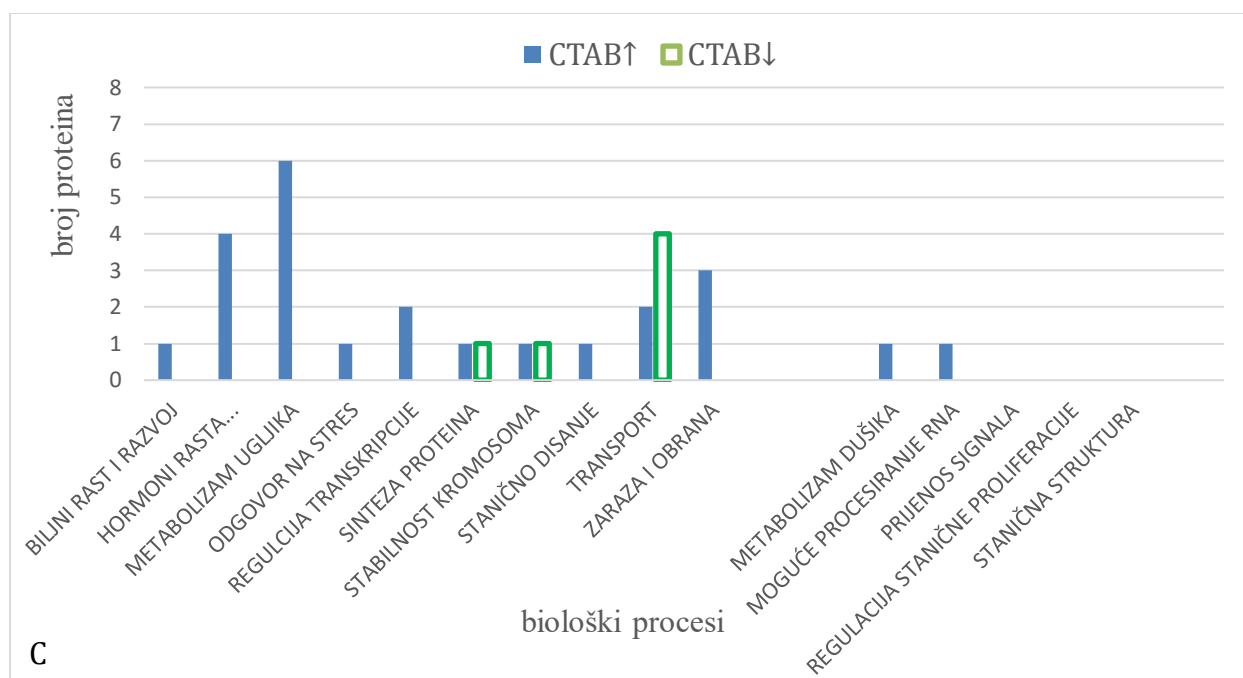
Unutar dolje navedenih kategorija, samo su proteini nekih tretmana pokazali razlikovnu ekspresiju u usporedbi s kontrolom. U kategoriji Metabolizam dušika ne nalazi se niti jedan protein s povećanom ili smanjenom ekspresijom u tkivu tretiranom s AgNP-citrat, a proteini iz drugih tretmana uglavnom su smanjene ekspresije. Kategorije Regulacija stanične proliferacije i Prijenos signala karakteristične su samo za tretmane s AgNP-citrat i AgNO₃, a po jedan protein u svakoj povećane je ekspresije. Procesiranje RNA

kategorija je specifična za tretman s AgNP-CTAB i AgNO₃, a protein ima pojačanu ekspresiju. Posljednja kategorija je Stanična struktura koja sadrži 4 proteina smanjene ekspresije u tretmanu s AgNP-PVP i AgNO₃ te jedan jače eksprimirani protein u AgNP-citratu i AgNO₃ otopini.

Proučavajući proteinske profile ukupnih topivih proteina tkiva korijena luka tretiranih različitim otopinama nanočestica i iona srebra uvidjela sam kako najveći broj proteina pokazuje isključivo povećanu ekspresiju, nešto manji broj proteina koji u različitim tretmanima pokazuju različitu ekspresiju, dok je broj proteina s isključivo smanjenom ekspresijom vrlo malen. Najviše je proteina razlikovne ekspresije u odnosu na kontrolu iz tretmana s AgNO₃.

Navedena kategorizacija za različite tretmane nanočesticama i ionima srebra grafički je prikazana na slikama 15A-D.





Slika 15. Kategorizacija identificiranih proteina (s razlikovnom ekspresijom u odnosu na kontrolu) korijena luka tretiranog s AgNP-citrat (A), AgNP-PVP (B), AgNP-CTAB (C) i AgNO₃ (D) prema njihovim biološkim procesima (dobivenima iz Uniprot-a)

5.RASPRAVA

Danas se nanočestice srebra koriste u mnogim granama industrije te komercijalno dostupnim proizvodima zbog čega raste zabrinutost o njihovom utjecaju na okoliš. Ovim se pitanjem bave mnoga toksikološka istraživanja nanomaterijala, ali većina je do danas provedena na bakterijama, algama, životinjskim i ljudskim stanicama. S ciljem doprinosa novim znanstvenim spoznajama o mehanizmima uključenima u odgovor biljaka na djelovanje nanočestica srebra ispitala sam učinak nanosrebra (AgNP) stabiliziranog različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) na ultrastrukturu i proteom stanica korijena biljne vrste *Allium cepa*. Taj sam utjecaj usporedila s učinkom ionskog srebra (iz AgNO₃) kako bih ustanovila potječe li mehanizam toksičnosti nanočestica od iona srebra (Ag⁺) koji se otpuštaju s nanočestica ili od samih nanočestica.

5.1. Morfološke i ultrastrukturne promjene

Kako su korijeni luka u neposrednom kontaktu s potencijalnim onečišćivačem, srebrom primijenjenim u različitim oblicima, promjene u njihovom rastu mogu dati informaciju o toksičnosti koju uzrokuje ionsko ili nanosrebro. Drugim riječima, inhibicija rasta korijena može pokazati da upotrebljena koncentracija iona ili nanočestica srebra negativno utječe na rast korijena (Yin i sur., 2011). Prvo opažanje koje sam zabilježila u početku provedbe eksperimenta bilo je da sam za dobivanje iste mase korijena potrebnih za daljnju analizu trebala iskoristiti dva puta više lukovica čiji su korijeni rasli u otopini srebrovog nitrata nego lukovica iz tretmana s nanočesticama srebra i kontrole. Ovakvo zapažanje ukazuje na to da je ionsko srebro imalo štetan učinak na rast korijena luka što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Krishnaraj i sur. (2012) pokazali su kako ionsko srebro sprječava klijanje biljne vrste *Ricinus communis*, utječe na inhibiciju rasta korijena i na povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima, a o istim učincima srebrovih iona na biljnu vrstu *Bacopa monnieri* izvijestili su i Yasur i sur. (2013). Vannini i sur. (2013) navode kako niske koncentracije AgNO₃ imaju stimulirajući učinak na rast korijena biljne vrste *Eruca sativa*, dok s porastom koncentracije dolazi do inhibicije ili potpunog zaustavljanja klijanja i rasta biljke.

Drugi parametar kojeg sam ispitivala bila je veličina, odnosno debljina, tj. promjer korijena. Uspoređujući tretmane nanočesticama s trima različitim omotačima, najmanji sam promjer izmjerila kod korijena luka tretiranog s AgNP-PVP. Nešto veću debljinu imao je korijen nakon tretmana s AgNO₃, zatim s AgNP-citrat, nakon njega kontrola, a najveći je promjer imao korijen iz tretmana s AgNP-CTAB. Dobiveni rezultati sugeriraju da AgNP-PVP djeluje inhibirajuće, a AgNP-CTAB stimulirajuće na rast korijena luka. Takva se opažanja slažu s dosadašnjim istraživanjima utoliko što su Vannini i sur. (2014) opisali inhibirajući učinak 45 µM AgNP-PVP na rast korjenčića žitarice *Triticum aestivum*, ali kosi sa zabilježenim stimulirajućim učinkom AgNP-PVP jednake koncentracije na rast korjenčića biljne vrste *Eruca sativa* (Vannini i sur., 2013) i neutralnim utjecajem različitih koncentracija AgNP-PVP u istraživanjima provedenima na vrstama *Ricinus communis* (Yasur i sur., 2013) i *Bacopa monnieri* (Krishnaraj i sur., 2012). Također, u dosadašnjim istraživanjima učinak AgNP-CTAB na rast biljaka uglavnom je negativan. Inhibirajući učinak AgNP-citrat, kao i u mome istraživanju, naveden je i u radu Leeja i sur. (2011) u kojemu je opisano negativno djelovanje nanočestica srebra omotanih citratnim anionima (135 µM) na klijanje biljnih vrsta *Phaseolus radiatus* i *Sorghum bicolor*. Iz dobivenih rezultata zaključujem da su vodene otopine AgNP-PVP i Ag⁺ koncentracije 75 µM imale najveći inhibirajući učinak na rast korijena, AgNP-citrat iste koncentracije nešto manje negativni utjecaj i konačno 75 µM Ag-CTAB imao je slabo stimulirajuće djelovanje na rast korijena biljne vrste *Allium cepa*.

Strukturne promjene u tkivu korijena luka promatrala sam svjetlosnim mikroskopom. Na poludebelim poprečnim i uzdužnim prerezima korijena luka nisam vidjela da je u tkivu nakon 72 h tretmana, bilo nanočesticama ili ionima srebra, došlo do strukturnih promjena koje bi se mogle uočiti optičkim mikroskopom. Vannini i sur. (2013) navode pak da je u stanicama tkiva vrha korijena biljne vrste *Eruca sativa* bio povećan broj vakuola nakon tretmana nanočesticama, ali da je takva pojava manje vidljiva u korijenima koji su rasli u vodenoj otopini srebrovog nitrata. Njihovi su rezultati u skladu s istraživanjem provedenim na vrsti *Lolium multiflorum* (Yin i sur., 2011). Transmisijskim elektronskim mikroskopom, kojim sam mogla razlikovati više staničnih struktura nego svjetlosnim, pokušala sam uočiti ultrastrukturne promjene u stanicama korijena luka, ali ni

na ultratankim prerezima nisam uočila da je došlo do morfoloških promjena u ultrastrukтури stanice nakon trodnevnog tretmana nanočesticama i ionima srebra. Vannini i sur. (2013) opisuju kako je nakon tretmana s AgNP i AgNO₃ došlo do smanjenja broja amiloplasta i veličine glatkog endoplazmatskog retikuluma. Nishikawa i sur. (2003) u vrsti *Chlamydomonas acidophila* uočili su ultrastrukturne promjene vakuola i membrane uzrokovane teškim metalima, kadmijem, cinkom i bakrom, a Choudhury i Panda (2005) opisali su morfološke promjene u strukturi tilakoidne membrane i kloroplasta nakon tretmana olovom i kromom. Rezultat kojeg sam dobila u svome istraživanju može biti posljedica niske primijenjene koncentracije tretmana ili kratkog vremena izlaganja istom, ali je vjerojatno ovisan i o biljnoj vrsti. Unutar stanica korijena tretiranog s nanočesticama Vannini i sur. (2013) opazili su malene crne nakupine, koje nisu uočene u kontrolnim korijenima, za koje su pretpostavili da potječu od nanočestica srebra apsorbiranih na površinu korijena vrste *Eruca sativa*. Takve malene točkaste crne nakupine i sama sam uočila u stanicama korijena luka tretiranog s AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB, a nisam ih uočila u kontroli niti korijenu raslom u vodenoj otopini AgNO₃. Zaključujem da nanočestice srebra mogu ući u stanice, u njima se bioakumulirati te tako doprinjeti štetnosti AgNP otpuštanjem Ag⁺ u blizini vitalnih staničnih komponenti (Vannini i sur., 2013).

Bioakumulaciju metalnih iona i posljedične toksične učinke na biljni organizam uočili su i opisali mnogi znanstvenici. Geremias i sur. (2009) nakon istraživanja učinka bakra na vrstu *Allium cepa* opisali su negativan učinak akumuliranog metala na rast biljke. Clemens (2006) je u proučavanju odgovora i tolerancije biljaka na učinak metala, čija se količina u okolišu posljednjih stotinjak godina značajno povećala, opisao negativan utjecaj kadmija, žive i olova na rast i razvoj biljaka te gubitak klorofila, a iste su rezultate na biljnoj vrsti *Brassica juncea* dobili John i sur. (2009). Deng i sur. (2004) istraživali su učinke nekoliko različitih metala (Pb, Zn, Cu, Cd) na močvarne biljne vrste i ustanovili kako su metali uglavnom akumulirani u korijenu. Bioakumulacija metala nije problem samo za biljke već i za čovjeka kako opisuju McLaughlin i sur. (1999) koji govore o akumuliranim metalima u jestivim biljkama kao potencijalnim opasnostima za ljudsko zdravlje te Wagner (1993) koji navodi kako 70% unosa kadmija potječe od biljne hrane.

5.2. Promjene u proteomskoj slici

Analizom 2-D gelova uočila sam ukupno 54 proteina koji su pokazali značajne razlike u ekspresiji u odnosu na one iz kontrolnog uzorka. Zbog toga što vrsta *Allium cepa* nema sekvencirani proteom, spektrometrijom masa izrezanih proteinskih mrlja i usporedbom dobivenih podataka s onima dobivenima iz drugih biljnih vrsta, identificirala sam 50 homolognih proteina, od čega 39 s promijenjenom ekspresijom, bilo povećanom ili smanjenom za sve ili isključivo neke uzorke. Promjene u proteomskoj slici ukupnih topivih proteina nakon izlaganja korijena luka stresnim uvjetima mogu biti rezultat različitih sposobnosti prilagodbe tkiva na stresne faktore, kao i varijacija u vrsti stresnih faktora koji u nekom trenutku djeluju na biljku (Rogić i sur., 2013). U svijetu se povećava zagađenost okoliša teškim metalima zbog čega isti predstavljaju jedan od značajnijih stresnih čimbenika za biljke, a da metali poput kadmija, olova, nikla i srebra mogu promijeniti ukupnu količinu proteina u biljci ustanovili su Ewais (1997) te Rostami i Ehsanpour (2009).

Malo je znanstvenih radova (Vannini i sur., 2013; Vannini i sur., 2014; Tiwari i sur., 2016) koji imaju proteomski pristup istraživanja utjecaja metala ili nanočestica metala u biljkama pa je značaj ovog to veći. Identificirane proteine svrstala sam prema zajedničkim biološkim kategorijama.

5.2.1. Proteini uključeni u odgovor na stres

Svi su živi organizmi izloženi utjecaju različitih tipova stresa koji mogu biti rezultat biotičkih i abiotičkih čimbenika. Biljke, kao sésilni organizmi, nemaju mogućnost učinkovitog izbjegavanja izvora stresa pa su morale razviti mnoge prilagodbe na promijenjive okolišne uvjete. Različite vrste abiotičkog stresa mogu u biljci uzrokovati denaturaciju i gubitak biološke aktivnosti proteina. U takvim uvjetima, da bi neutralizirale utjecaj stresa, biljke mogu mijenjati ekspresiju gena i akumulaciju proteina (Yan i sur., 2005). Proteini toplinskog šoka (HSPs od eng. *Heat Shock Proteins*), koji djeluju kao molekularni šaperoni, sudjeluju u odgovoru biljke na stres tako da kontroliraju pravilno trodimenzijsko smatanje strukturnih (npr. membranskih) i funkcionalnih (npr. enzima) proteina (Whitley i sur., 1999; Vincour, 2005), te stabiliziraju proteine (Huttner i Strasser,

2012) zbog čega imaju zaštitnu ulogu u biljci. Nakon tretmana s AgNP-citrat, u korijenima luka bila je povećana ekspresija šaperonina Hsp60, proteina odgovornog za sprječavanje krivog smatanja proteina, ali i promoviranje odmatanja te odgovarajućeg formiranja odmotanih polipeptida nastalih uslijed stresnih uvjeta u matriksu mitohondrija. Takva povezanost povišene ekspresije proteina Hsp i abiotičkog stresa uočena je i u biljci *Arabidopsis thaliana* (Sung i sur., 2001; Swindell i sur., 2007). Povećanu ekspresiju proteina toplinskog šoka zabilježili su Wollgiehn i Neumann (1999) nakon tretiranja biljnih vrsta *Silene vulgaris* i *Lycopersicon peruvianum* s ionima teških metala, tj. živom, bakrom, kadmijem i cinkom, a opazili su kako tolerancija biljaka na toksični utjecaj metala ovisi i o vrsti metala i o samoj biljci. Heckathorn i sur. (2004) dokazali su istraživanjem utjecaja nikla i olova na biljku *Zea mays* kako ekspresija HSP štiti fotosintetski aparat od štetnog utjecaja teških metala. Isključivo u korijenima tretiranim s AgNP-citrat povišena je ekspresija još jednog proteina koji sudjeluje u odgovoru na stres; X1-izoforme PH-interagirajućeg proteina koji je uključen u unutarstaničnu signalizaciju omogućavajući interakciju s komponentama puta prijenosa signala.

Jedna od posljedica utjecaja stresa na biljne stanice je i prekomjerna proizvodnja reaktivnih oblika kisika (ROS od eng. *reactive oxygen species*) koji u povoljnim okolišnim uvjetima čine signalnu mrežu i kontroliraju široki spektar bioloških procesa (npr. rast, razvoj, odgovor na a/biotičke čimbenike) (Mittler i sur., 2011). Povećanje količine ROS u stanici može dovesti do pojave oksidacijskog stresa i nastanka slobodnih radikala jer su ROS jaka oksidacijska sredstva koja uzrokuju oksidacijske štete na biomolekulama što dovodi do slabljenja integriteta membrana i posljedičnog povećanja propuštanja elektrolita te potencijalne smrti stanice (Anjum i sur., 2013). Zbog toga su biljke stvorile učinkovite mehanizme obrane, tj. antioksidacijske enzime (Zhang i sur., 2005) i molekule koje razgrađuju ROS (Balen i sur., 2013), a jedna od njih je i askorbat-peroksidaza (APX od eng. *ascorbate peroxidase*) koja ima ključnu ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida, nastalog u biljnoj stanici uslijed procesa lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007), pretvarajući ga u vodu (Ahmad i sur., 2010). U mojem istraživanju ekspresija proteina APX bila je povećana u korijenima luka tretiranim i s različito omotanim AgNP i s AgNO₃ što dovodi do zaključka kako i ionsko i nanosrebro uzrokuju oksidacijski stres u stanicama korijena vrste *Allium*

cepa. Moguće je i kako je takav stres uzrokovan akumulacijom srebra disociranog s nanočestica (Oukarroum i sur., 2013). Takvo povećanje ekspresije APX povezano s kontrolom regulacije razine H_2O_2 u procesu oksidacijskog stresa potaknutog metalima opisali su i Quereshi i sur. (2005). Hatami i Ghorbanpour (2013) zabilježili su povećanje aktivnosti APX u listovima *Pelargonium zonale* nakon tretmana s AgNP, a Qin i sur. (2005) u *Fragaria x ananassa* nakon tretmana s $AgNO_3$. Osim srebra i mnogi drugi teški metali uzrokuju oksidacijski stres u biljkama; Gallego i sur. (1996) navode željezo, bakar i kadmij, Chaoui i sur. (1997) kadmij i cink, Cvjetko, P. i sur. (2010) bakar i kadmij, Valko i sur. (2005) krom, vanadij, kobalt, nikal, itd. Od proteina uključenih u odgovor biljaka na stresne čimbenike još je protein otporan na bentazon i sulfonilureju, herbicide korištene za suzbijanje jednogodišnjih širokolisnih korova, povećane ekspresije u svim korijenima.

5.2.2. Proteini uključeni u sintezu proteina

60S ribosomalni protein L12 (RPL12) jedan je od proteina koji čine veliku podjedinicu eukariotskog ribosoma, a veže se izravno na 26S ribosomalnu RNA i tako sudjeluje u procesu translacije, tj. sinteze proteina (Grebenyuk i sur., 2009). Iako je dio translacijskog mehanizma, pretpostavlja se da RPL12 ima i dodatnu ribosomsku funkciju signalizacije stresa kojom omogućuje stanici da osjeti i reagira na promjene u okolišu (Wool, 1996; Warner i McIntosh, 2009). Njegova je ekspresija povećana u korijenima luka tretiranim s AgNP-citrat, AgNP-CTAB, a smanjena u onima tretiranim s AgNP-CTAB i $AgNO_3$. Prema Kawasaki i sur. (2001) i Bohnert i sur. (2001) sinteza ribosoma i popratna povećana ekspresija translacijskih faktora odgovornih za restrukturiranje proteoma vrlo su rani događaji u odgovoru biljaka na (solni) stres te se njihova sinteza smanjuje kako se stres nastavlja.

5.2.3. Proteini uključeni u stresom inducirane promjene u metabolizmu stanice

5.2.3.1. Proteini uključeni u metabolizam ugljika

Kad su pod utjecajem stresnih čimbenika, aktivnosti enzima i bazalni metabolizam biljnih stanica su poremećeni, zbog čega biljke moraju učvrstiti mehanizme otpornosti na

stres. Takvi procesi zahtijevaju dodatne zalihe energije, a kao posljedica, metabolizam ugljikohidrata i razine pojedinih šećera postaju narušeni (Vinocur, 2005).

Enolaze su enzimi uključeni u glikolizu, tj. odgovorne su za katalizu konverzije 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat tijekom glikolitičkog procesa. Riccardi i sur. (1998), Lai i sur. (1998), Forsthoefel i sur. (1995) te Umeda i sur. (1994) pokazali su kako je aktivnost enolaze regulirana mnogim okolišnim stresorima (solni stres, suša, hladnoća, anoksični uvjeti) u mnogim biljnim vrstama izloženima stresu i to na način da je njena ekspresija jako povećana. Ekspresija enolaza u mojem je istraživanju povišena u svim korijenima, bilo tretiranim s nanočesticama srebra ili ionskim srebrom, što je u skladu s gore navedenim rezultatima istraživanja drugih znanstvenika. Drugi protein čija je ekspresija bila povećana u svim korijenima luka je trioza fosfat izomeraza koja katalizira reverzibilnu konverziju trioza fosfat izomera (dihidroksiaceton fosfata i D-gliceraldehid 3-fosfata) i za koju je u dosadašnjim radovima dokazano da joj je ekspresija inducirana sušom i solnim stresom (Riccardi i sur., 1998; Salekdeh, 2002; Yan i sur., 2005).

Osim ekspresije enolaza i trioza fosfat izomeraze, također je povećana ekspresija ostalih glikolitičkih enzima koje sam pronašla u korijenima vrste *Allium cepa* tretiranih s AgNP i AgNO₃. U navedene spadaju plastidna aldolaza (u UniProt imenovana kao fruktoza 1,6-bisfosfat aldolaza) koja katalizira reverzibilnu reakciju razgradnje fruktoza 1,6-bisfosfata u dihidroksiaceton fosfat i gliceraldehid 3-fosfat, citosolna gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPD) koja katalizira prvi korak zamjene D-gliceraldehid 3-fosfata u 3-fosfo-D-glicerol fosfat, tj. sudjeluje u razgradnji glukoze i esencijalna je za održavanje razine ATPa u stanici, te supstrat-neovisna fosfogliceromutaza (iPGAM) koja katalizira interkonverziju 2-fosfoglicerata i 3-fosfoglicerata. Povećanu ekspresiju GAPD i njezin utjecaj na povećanu toleranciju biljaka na stres (uzrokovan nedostatkom vode) opisali su Kappachery i sur. (2015) te Jeong i sur. (2001) koji su pokazali kako transgenične biljke krumpira u koje je ugrađen gen *GAPD* pokazuju povećanu toleranciju na solni stres. Da plastidna aldolaza i njena povećana aktivnost igra važnu ulogu u odgovoru na solni stres u *Camellia oleifera* naveli su Zeng i sur. (2015).

Zanimljivo je spomenuti kako se nekoliko glikolitičkih enzima, primjerice GAPD, mogu okarakterizirati kao multifunkcionalni proteini koji pokazuju funkcijsku raznovrsnost u biljkama (Rius i sur., 2008; Bronwyn i sur., 2009). Gancedo i Flores (2008) dokazali su kako taj enzim glikolitičkog puta ima i ulogu u drugim, nemetaboličkim procesima zvanima *moonlighting functions*. Jedna od uloga pripisana tom proteinu je sudjelovanje u odgovoru stanice na oksidativni stres (Sirover, 2011). U *Arabidopsis thaliana* otkriveno je kako GAPD reagira s H_2O_2 pa Hancock i sur. (2005) pretpostavljaju da navedeni enzim posreduje u signalnom putu ROS koji djeluju kao signalne molekule (Mittler, 2002) za ekspresiju gena uključenih u biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula uključenih u obranu biljke. Zörb i sur. (2004) navode kako citosolna GAPD ima važnu ulogu u toleranciji biljke na stresne uvjete, vjerojatno putem regulacije količine H_2O_2 , a isto su opisali i Jeong i sur. (2001) u krumpiru te Zhang i sur. (2011) u riži.

Kloroplastna fosfoglicerat-kinaza dio je enzima koji sudjeluju u Calvinovom ciklusu, tj. biološki je katalizator reakcije fosforilacije 3-fosfoglicerata pri čemu se stvara 1,3-bisfosfoglicerat i ADP. Njena je ekspresija povećana u korijenima tretiranima i s AgNP i s $AgNO_3$, što se slaže s dosadašnjom pretpostavkom kako je aktivnost proteina koji sudjeluju u procesu ugljikohidratnog metabolizma pojačana uslijed potrebe stanice za većom količinom energije kao posljedice obrane od stresa. Opažanja vezana za proteine uključene u metabolizam šećera navode na zaključak kako je regulacija tih enzima esencijalna za aktivaciju puteva koji proizvode energiju. Yan i sur. (2005) opisali su kako je vjerojatno da biljke smanjuju potrošnju glukoze u sintetskim putevima usmjeravajući je u cikluse koji proizvode dodatnu energiju potrebnu za održavanje homeostaze nakon djelovanja stresnih čimbenika.

5.2.3.2. Proteini uključeni u metabolizam dušika

U biljnim se stanicama pod stresnim uvjetima zbiva povećana proteolitička aktivnost, djelomično pod regulacijom ROS, a to za posljedicu ima povećanje unutarstaničnih koncentracija amonijaka i nitrata koji potencijalno mogu biti toksični ukoliko se ne uklone (Skopelitis i sur., 2006). Glutamat-amonij-ligaza, tj. glutamin-sintetaza (GS) je enzim koji katalizira pretvorbu anorganskog dušika (amonijaka) u organsku formu

(glutamin) i to na način da iz glutamata i amonijaka sintetizira aminokiselinu glutamin. Ekspresija ovog proteina bila je povećana u korijenima tretiranim s AgNP-CTAB, što je u skladu s istraživanjima koja dokazuju kako je GS protein koji pokazuje iznimnu up-regulaciju pri solnom stresu u riži i korijenima vrste *Arabidopsis thaliana* (Nam i sur., 2012; Yan i sur., 2005; Wang i sur., 2012). Zbog toga veoma čude rezultati dobiveni za korijene tretirane s AgNP-PVP i AgNO₃, a u kojima je ekspresija GS smanjena. Iako među proteinima nisam identificirala glutamat-dehidrogenazu (GDH) možda je u korijenima iz navedenih tretmana ekspresija ovog enzima, koji igra važnu ulogu u putevima u kojima se detektira povećana koncentracija ROS u stanici i koji sukladno tome modulira odgovor te iste stanice (Skopelitis i sur., 2006), izrazito povećana pa isključivo on obavlja funkciju metaboliziranja suviška amonijevih iona stvaranjem glutamata. Nastali glutamat može dalje ići u puteve sinteze prolina koji sudjeluje u regulaciji osmolarnosti u stresnim uvjetima (Skopelitis i sur., 2006). Gouia i sur. (2003) opisali su utjecaj kadmija na aktivnosti enzima uključenih u metabolizam dušika biljne vrste *Phaseolus vulgaris*, tj. naveli su izrazito pojačanu aktivnost GDH.

5.2.4. Proteini uključeni u proces zaraze i obrane

Proteini uključeni u procese zaraze i obrane koje sam identificirala u korijenima luka; T-filoplaninu sličan protein, RNA-vezni protein s bromdomenom i protein s NB-ARC domenom, povećanih su ekspresija u tkivima svih korijena. NB-ARC domena središnji je dio nekih proteina uključenih u obranu biljke od zaraze patogenima (eng. *resistance proteins*, R proteini) i služi kao vezno mjesto preko kojeg se regulira aktivnost tog proteina (van Ooijen i sur., 2008). Vjerojatno je da postoji određeno preklapanje signalnih puteva koje aktivira stres i onih koje aktivira infekcija patogenom ili ranjavanje, no stvarni međuodnos tih gena i dalje je nepoznat te su potrebna dodatna istraživanja koja bi objasnila fiziološku i biokemijsku ulogu tih gena. Poznavanje funkcija R proteina i mehanizama kojima prepoznaju patogene može potencijalno dovesti do razvoja dugoročne strategije za kontrolu i prevenciju napada patogenih organizama na biljne vrste korisne čovjeku.

5.2.5. Proteini uključeni u biljni rast i razvoj te hormoni rasta

S-adenozilmetionin sintetaza, tj. metionin-adenoziltransferaza (MAT) enzim je koji katalizira stvaranje S-adenozilmetionina (AdoMet) iz metionina i ATPa. Metabolizam sintetiziranog AdoMet uključen je u rast biljke preko biljnih hormona rasta (Espartero i sur., 1194). MAT je ujedno i pripadnik proteina induciranih stresom čija povećana ekspresija doprinosi toleranciji biljke na stres. To je dokazano istraživanjem na rajčici u kojemu su Gong i sur. (2015) otkrili kako izrazito povišena ekspresija MAT povisuje toleranciju tkiva rajčice na lužnati stresor kroz regulaciju poliamina i vodikovog peroksida. Stoga ne čudi da je i u mom istraživanju ekspresija proteina MAT bila povišena u tkivu korijena luka tretiranih s nanočesticama i s ionskim srebrom.

GRAS proteini čine važnu porodicu specifično biljnih proteina čije su zadaće uglavnom u rastu i razvoju biljaka, ali često imaju i regulatornu ulogu kao transkripcijski faktori (Hirsch i Oldroyd, 2009). Opisano je kako se ekspresija nekih od GRAS proteina povećava uslijed djelovanja stresnih okolišnih čimbenika, a isti proteini sposobni su povećati toleranciju biljke na te stresore, npr. na sušu i tretman solju (Ma i sur., 2010). U svom istraživanju identificirala sam jedan GRAS transkripcijski faktor; NSP2 (eng. *nodulation signaling pathway 2*) protein koji tvori kompleks s promotorom nodulacije (Hirsch i sur., 2009). Ovaj protein ima povećanu ekspresiju u tkivima svih korijena luka što je u skladu s istraživanjem Ma i sur. (2010).

5.2.6. Proteini uključeni u staničnom disanju

Krebsov ciklus, tj. ciklus limunske kiseline jedan je od temeljnih metaboličkih ciklusa za stanice koje koriste kisik u procesu staničnog disanja, a odvija se u mitohondrijima kod eukariotskih organizama. Posljednja reakcija ovog ciklusa je oksidacija malata u oksaloacetat čime se isti regenerira i ulazi u novi ciklus. Taj korak katalizira enzim malat-dehidrogenaza koja koristi još jednu molekulu NAD^+ kao primatelja vodika kako bi proizveo NADH. Wang i sur. (2016) dokazali su da povećana ekspresija citosolne malat-dehidrogenaze doprinosi poboljšanoj toleranciji solnog i temperaturnog stresa u jabuci i to putem reguliranja redukcijskog stanja i količine salicilne kiseline u biljci. U svojem sam

istraživanju identificirala tri proteinske mrlje kao malat-dehidrogenaze, a razine njihovih aktivnosti se razlikuju; ekspresija je povećana u tkivu korijena luka tretiranog s AgNP-citrat i AgNP-CTAB, a smanjena za AgNP-PVP i AgNO₃.

5.2.7. Proteini uključeni u regulaciji transkripcije

Biljke imaju složeni regulacijski mehanizam kojim se brane protiv mnoštva bioloških i abiotičkih faktora stresa. Kao odgovor na stres, biljne stanice aktiviraju obrambeni signalni put koji zahtijeva znatnu metaboličku aktivnost, ponekad nauštrb staničnih funkcija vezanih za rast i razvoj biljke. Iako je takav fenomen znanstvenicima otprije poznat, još im uvijek nije jasan mehanizam takvog odgovora biljke na stresne čimbenike. Zbog toga je jedan od proteina, povećane ekspresije u tkivima svih korijena luka, osobito zanimljiv jer ima dvojaku funkciju; faktor regulacije rasta 3, transkripcijski je aktivator uključen u regulaciju ekspanzije stanica u tkivu lista i kotiledona, a također sudjeluje i kao regulator razvoja u reprogramiranju stanica korijena tijekom infekcije patogenima (Omidbakhshfard i sur., 2015). Na pitanje kako taj protein "odabire" koju će funkciju obnašati pokušali su odgovoriti Liu i sur. (2014).

5.2.8. Proteini uključeni u procese transporta i prijenosa signala

Jedna od najvažnijih strategija koje su biljke razvile da bi se oduprle utjecaju stresnih čimbenika je kompartmentalizacija iona u vakuoli kako bi održale nisku koncentraciju soli u citoplazmi (Hasegawa i sur., 2000; Mimura i sur., 2003). Regulacija kretanja iona kroz tonoplast ovisna je o elektrokemijskom gradijentu stvorenom pomoću vakuolarnih protonskih pumpi. Vakuolarne pumpe (V-ATPaze) su proton-translocirajući enzimi smješteni u brojnim unutarstaničnim organelima, ali i u staničnim membranama mnogih eukariotskih stanica (Finbow i Harrison, 1997). Posljedično, regulacija aktivnosti ovog enzima ima važnu ulogu u toleranciji biljke na solni stres. U mojem su istraživanju vakuolarne pumpe imale povećanu ekspresiju, a takvo se opažanje slaže s rezultatima istraživanja utjecaja solnog stresa na biljnoj vrsti *Vigna unguiculata* u kojoj su V-ATPaze također up-regulirane (Menzes Sobreira i sur., 2014).

5.2.9. Proteini uključeni u regulaciju stanične proliferacije

Staničnom proliferacijom iz jedne nastaju dvije stanice, ali osim same diobe, proliferacija uključuje i kontrolirani rast stanice (nekontrolirana dioba i rast stanice = rak). Stanična signalizacija važna je u kontroli stanične proliferacije, a fosforilacija je jedan od mehanizama prijenosa informacija iz vanstaničnog okoliša u prostor unutar stanice. Serin/treonin protein kinaza vrsta je transferaze, a konkretno je enzim koji fosforilira OH-grupu na serin ili treonin aminokiselini fosfatom s ATPa, pritom funkcionalno mijenjajući protein koji ima tu aminokiselinu u svom aminokiselinskom slijedu, a tako konačno sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije (Hardie, 1999).

X2-izoforma serin/treonin protein kinaze koju sam identificirala u svome istraživanju povećane je ekspresije u tkivu korijena luka tretiranih s AgNP-citrat i AgNO₃. Protein-kinaze općenito su odgovorne ne samo za regulaciju stanične proliferacije, nego sudjeluju i u omogućavanju drugih staničnih procesa. Između ostalog, njihova se važnost očituje u signalizaciji za vrijeme stresnih uvjeta, tj. imaju važnu ulogu u prepoznavanju stresnih faktora i posljedičnoj aktivaciji mehanizama obrane biljke (Romeis, 2001). Ranije u tekstu navela sam kako će biljke u stresnim uvjetima, na štetu rasta i razvoja, dakle i stanične proliferacije, iskorištavati energiju za uspostavljanje homeostaze. Zbog toga je vjerojatno kako je ekspresija X2-izoforme serin/treonin protein kinaze povećana zbog njezine funkcije u signalnom putu koji omogućuje odgovor na stres, a ne radi promoviranja stanične proliferacije.

5.2.10. Proteini odgovorni za stabilnost kromosoma

Histoni su bazični proteini koji se nalaze u jezgri stanice i imaju ključnu ulogu u pakiranju DNA; po dva H2B (sa 6 drugih histona) zajedno s DNK čine nukleosom, a histon H1 pomaže u slaganju nukleosoma u kondenzirani oblik DNK, tj. kromatin. Prema Pawlack i Decker (2007), okolišni stres uzrokuje izraženu ekspresiju histona H2B što uzrokuje modifikacije u kromatinu. Takvi događaji rezultiraju promjenama u genskoj ekspresiji na način da u stanici dolazi do veće eksprimiranosti proteina zaduženih za obranu od stresa.

Zbog toga nije čudno da je ekspresija tog proteina u mom istraživanju povećana u korijenima luka iz AgNP-CTAB tretmana.

5.2.11. Proteini koji sudjeluju u izgradnji stanične strukture

Tubulini su obitelj proteina koji su sastavni dio mikrotubula, komponente citoskeleta eukariotskih stanica (Gunning i sur., 2015) koji su važni za neke od ključnih staničnih procesa, uključujući i odgovor na abiotički stres (Nick, 1998). Sastoje se od 6 manjih obitelji, od kojih su najvažniji α i β tubulini. Mikrotubuli igraju ulogu u prepoznavanju stresnih uvjeta i odgovarajućem odgovoru na taj stres. Livanos i sur. (2014) spominju kako su u stanicama pogođenima oksidativnim stresom pronašli povećanu ekspresiju različitih izoforma tubulina. Konkretni mehanizam kojim tubulini sudjeluju u povećanju tolerancije biljke na stres nije opisan, ali se pretpostavlja da ROS uzrokuju modifikacije u tubulinima koje mogu spriječiti stanična oštećenja. Prema tome, povećana ekspresija tubulin alfa-3 lanaca u korijenima luka iz Ag-citrat i AgNO₃ ne čudi. Drugi protein kojeg sam identificirala i odredila mu različitu ekspresiju u odnosu na kontrolu je aktin, protein koji izgrađuje citoskelet biljnih stanica. Premda nisam pronašla znanstvene radove o konkretnom utjecaju abiotičkog stresa na ekspresiju aktina u biljkama, pretpostavljam da aktin ne sudjeluje direktno u obrani od stresnih čimbenika pa smanjena ekspresija aktina 1 i 2 u tkivu korijena luka tretiranih s AgNP-PVP i AgNO₃ nije neočekivani rezultat jer isti sudjeluju u izgradnji stanične strukture, a u uvjetima stresa biljka će svoje resurse usmjeravati u poticanje ekspresiranja onih proteina koji sudjeluju u održavanju homeostaze i obrani od trenutnih uzročnika stresa.

5.2.12. Proteini uključeni u procesiranje RNA

Proteini sa trikopeptidnim ponavljajućim sljedovima sastoje se od ponavljajućih sekvenci 35 aminokiselina, a njihova se funkcija u biljnom organizmu još uvijek istražuje, iako je poznato kako u *Arabidopsis thaliana* interagiraju s mitohondrijima i kloroplastima (Lurin i sur., 2004). Pretpostavlja se da bi mogli biti uključeni u procesiranje RNA, tj. njezino izrezivanje, uređivanje, stabilnost i translaciju (Kotera i sur., 2005, Nakamura i sur.,

2012. Manna, 2015), premda su mnogi drugi proteini također potrebni da bi se isto dogodilo (Takenaka, i sur. 2010). Pronađeno je i da jedan od proteina iz te obitelji u *Arabidopsis thaliana* ima ključne uloge u odgovoru na solni i temperaturni stres te sušu. Jiang i sur. (2015). navode kako povećana ekspresija ovog proteina utječe na poticanje ABA-induciranog zatvaranja stoma, tj. inhibiranje njihovih otvaranja i tako pomaže u otpornosti biljke na stresne uvjete. S takvim se pronalascima slaže i rezultat mojeg istraživanja, tj. povećana ekspresija At1g74900 proteina s pentatrikopeptidnim ponavljajućim sljedovima u korijenima luka tretiranih s AgNP-CTAB i AgNO₃. Zanimljivo je kako su Jiang i sur. (2015) također pronašli da ovaj protein pomaže u toleranciji na stresne čimbenike u fazi germinacije, a pritom nema negativan učinak na rast biljke.

.....

Premda sam u proteinskim profilima korijena luka tretiranih otopinama različito omotanih nanočestica i iona srebra pronašla 50 proteinskih mrlja s razlikovnim ekspresijama, spektrometrijom masa uspjela sam identificirati njih 39. Svrstala sam ih prema biološkim kategorijama, analizirala funkcije i ekspresije najvažnijih proteina, a rezultati su sljedeći: najviše proteina pokazalo je u najvećem broju tretmana povećanu ekspresiju, a među njima se najviše ističu proteini koji su na neki način povezani s odgovorom na stresne čimbenike, tj. nanočestice i ione srebra, te održavanjem homeostaze u stresnim uvjetima. Istovremeno, smanjena ekspresija javlja se u malom broju identificiranih proteina i to uglavnom onih koji sudjeluju u biljnom rastu i razvoju, a razlog se krije u činjenici da će biljka pod stresom svoju energiju ulagati u obranu od stresa, a ne u staničnu proliferaciju i diferencijaciju. Zanimljivo je da dio proteina pokazuje i smanjenu i povećanu ekspresiju za različite tretmane, zbog čega mogu zaključiti da različiti omotači drukčije doprinose utjecaju nanočestica srebra na stanice korijena luka. Također, tretman otopinom srebrova nitrata, tj. ionima srebra, uzrokovao je najviše promjena u tikvu korijena, odnosno ekspresija najvećeg broja različitih proteina pokazala se drugačijom nego u kontroli.

Zbog toga što pozitivna identifikacija proteina vodi do otkrića eksprimiranih gena koji igraju ulogu u toleranciji biljaka na stres, proteomska istraživanja takvog stresa imaju potencijal otkriti gene koje bi se moglo unaprijediti i koristiti radi poboljšanja otpornosti biljaka na stres (Salekdeh i sur., 2002). Kompleksna istraživanja utjecaja različitih abiotičkih čimbenika stresa na fiziologiju, metabolizam i mehanizam obrane biljke sve se više provode i razvijaju, ali sama identifikacija i kvantifikacija proteina nije dovoljna da se do kraja razjasne mehanizmi koje biljka koristi u odgovoru na stres, tj. u obrani od istog. Zbog toga bi znanstvena istraživanja trebalo nastaviti opsežnim analizama proteinskog statusa stanice; lokalizacije, modifikacije, interakcije, aktivnosti i funkcije određenih proteina.

6. ZAKLJUČAK

1. Nanočestice srebra, različito nabijene i stabilizirane trima različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB), vrlo su raznolike i po veličini i obliku. Veličina varira od 10-100 nm.
2. Nema značajnih razlika u strukturi i ultrastrukturi stanica i organela nakon 72 h izlaganja tretmanima s različito stabiliziranim nanočesticama (AgNP) i ionima srebra (AgNO_3). Značajna razlika vidljiva je jedino u debljini korijena.
3. Nanočestice srebra su neovisno o tipu omotača ušle u stanice i tamo se akumulirale.
4. Ionsko srebro i nanočestice srebra uzrokuju pojačanu ekspresiju velikog broja proteina dok je manjem broju proteina ekspresija smanjena.
5. Proteine zajedničke svim tretmanima može se razvrstati u 10 različitih kategorija. Proteinima koji sudjeluju u metabolizmu ugljika, mehanizmu obrane od stresa, biljnom rastu i razvoju, procesima vezanim za hormone rasta, staničnom disanju i regulaciji transkripcije ekspresija je pojačana, a proteinima koji su uključeni u transport, zarazu i obranu, sintezu proteina i stabilnost kromosoma ekspresija je smanjena.
6. Proteini koji nisu zajednički svim tretmanima različito su međusobno eksprimirani i može ih se razvrstati u 5 različitih kategorija: metabolizam dušika (AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO_3), procesiranje RNA (AgNP-CTAB, i AgNO_3), prijenos signala (AgNP-citrat i AgNO_3), regulacija stanične proliferacije (AgNP-citrat i AgNO_3) i stanična struktura (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNO_3).
7. Najviše proteinskih mrlja s pojačanom ekspresijom uočeno je u tretmanu s AgNP-citrat (45), zatim u tretmanu s AgNO_3 (34) i AgNP-CTAB (32), a najmanje u tretmanu s AgNP-PVP (23). Istovremeno, najviše proteinskih mrlja sa smanjenom ekspresijom uočeno je u tretmanu s AgNP-PVP (12), zatim u tretmanu s AgNO_3 (10), a najmanje u tretmanu s AgNP-CTAB (4). U tretmanu s AgNP-citrat nije uočena niti jedna proteinska mrlja sa smanjenom ekspresijom.

7.LITERATURA

Abramowitz, M. (2003) Microscope basics and beyond. Olympus America Inc., Scientific Equipment Division, Two Corporate Center Drive, Melville, New York.

Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J. (2010) Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242: 263-269.

Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S. (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3): 161-175.

Altelaar, A.F.M., Munoz, J., Heck, A.J.R. (2013) Next generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nature Reviews Genetics*, 14: 35-48.

Anderson, L.N., Anderson, N.G. (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19; 1853-1861.

Anjum, N.A., Gill, S.S., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I. (2013) Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1896.

Balen, B., Pavoković D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M. (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveučilišna naknada, Zagreb.

Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Peharec Štefanić, P., Rončević, S., Pitarević Svedružić, L., Krsnik-Rasol, M. (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49: 421-432.

Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland D.S., Autrup, H. (2012) Toxicity of silver nanoparticles - Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, 208: 286-292.

Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 4: 317-339.

Bohnert, H.J., Ayoubi, P., Borchert, C., Bressan, R.A., Burnap, R.L., Cushman, J.C., Cushman, M.A., Deyholos, M., Fischer, R., Galbraith, D.W., Hasegawa, P.M. (2001) A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 295-311.

Bozzola, J.J., Russell, L.D. (1998) Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. 2nd Edition, Jones and Barlett Publishers, Inc.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bronwyn, J.B., Vera-Estrella, R., Hernandez-Coronado, M., Pantoja, O. (2009) Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. *The Plant Cell*, 21: 4044-4058.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Habib Ghorbal, M., El Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127: 139-147.

Cheung, K.L., Chen, H., Chen, Q., Wang, J., Ho, H.P., Wong, C.K., Kong, S.K. (2012) CTAB-coated gold nanorods elicit allergic response through degranulation and cell death in human basophils. *Nanoscale*, 4: 4447-4449.

Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L., Surampalli, R.Y., Hu, Z. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42(12): 3066-3074.

Choudhury, S., Panda, S.K. (2005) Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, and Soil Pollution*, 167(1): 73-90.

Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707-1719.

Cvjetko, P., Tolić, S., Šikić, S., Balen, B., Tkalec, M., Vidaković-Cifrek, Ž., Pavlica, M. (2010). Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61(3): 287-296.

De Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007) Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3. izd., John Wiley & Sons, Ltd, Brussels

Deng, H., Ye, Z.H., Wong, M.H. (2004) Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution*, 132: 29-40.

Espartero, J., Pintor-Toro, J.A., Pardo, J.M. (1994) Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Molecular Biology*, 25(2): 217-227.

Ewais, E.A. (1997) Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia planetarium*, 39(3): 403-410.

Fabrega, J. Renshaw, J.C., Lead, J.R. (2009) Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Science and Technology*, 43: 9004-9009.

Fatima, R.R. (2004) Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*, 346: 256-273.

Faraji, M., Yaminia, Y., Tahmasebia, E., Saleha, A., Nourmohammadianb, F. (2010) Cetyltrimethylammonium bromide-coated magnetite nanoparticles as highly efficient adsorbent for rapid removal of reactive dyes from the textile companies' wastewaters. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7: 130-144.

Faurobert, M. Pelpoir, E., Chaib, J. (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular biology*, 335: 9-14.

Finbow, M.E., Harrison, M.A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochemistry Journal*, 324(3): 697-712.

Forsthoefel, N.R. (1995) Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant mesembryanthemum crystallinum L. *Plant Physiology* 108: 1185-1195.

Galić, N., Cindrić, M. (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kemija u industriji*, 57: 231-243.

Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121: 151-159.

Gancedo, C., Flores, C. (2008) Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72: 197-210.

Geremias, R., Fattorini, D., Favere, V.T.D., Pedrosa, R.C. (2009) Bioaccumulation and toxic effects of copper in common onion *Allium cepa* L. *Journal of Chemical Ecology*, 1: 19-26.

Geremias, R., Fattorini, D., Favere, V.T.D., Pedrosa, R.C. (2011) Bioaccumulation and adverse effects of trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in the common onion *Allium cepa* as a model in ecotoxicological bioassays. *Journal of Chemical Ecology*, 6: 515-522.

Ghodake, G., Seo, Y.D., Lee, D.S. (2011) Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 952-955.

Gong, B., Wang, X., Wei, M., Fengjuan, Y., Li, Y., Shi, Q. (2015) Overexpression of S-adenosylmethionine synthetase 1 enhances tomato callus tolerance to alkali stress through

polyamine and hydrogen peroxide cross-linked networks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(2): 377-391.

Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H. (2003) Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 160: 367-376.

Grebenyuk, E., Dokrunova, A., Davydov, I., Tonevitsky, E., Tonevitsky, A. (2009) Studying the copy number of ribosomal protein L7/L12. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 147: 587-591.

Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., Robinson, R.C. (2015) The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *Journal of Cell Science*, 128(11): 2009-2019.

Gygi, S.P., Aebersold, R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 489-494.

Hancock, J.T., Henson, D., Nyirenda, M., Desikan, R., Harrison, J., Lewis, M., Hughes, J., Neill, S.J. (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 828-835.

Hardie, D.G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 97-131.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

Hatami, M., Ghorbanpour, M. (2013) Effect of nanosilver on physiological performance of Pelargonium plants exposed to dark storage. *Journal of Horticultural Research*, 21(1): 15-20.

Heckathorn, S.A., Mueller, K., LaGuidice, S., Zhu, B., Barrett, T., Blair, B., Dong, Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany*, 91(9): 1312-1318.

Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D. (2009) GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 21(2):545-557.

Hirsch, S., Oldroyd, G.E.D. (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8): 698-700.

Hossein, Z., Komatsu, S. (2013) Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in Plant Science*, 3: 112.

Huttner S., Strasser R. (2012) Endoplasmatic reticulum-associated degradation of glycoproteins in plants. *Frontiers in Plant Science*, 3: 67.

Ivanković, M. (2011) Nanomaterijali i nanoprodukti – mogućnosti i rizici. *Polimeri: časopis za plastiku i gumu*, 32(1): 23-28.

James, P. (1997) Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Review of Biophysics*, 30; 279-331.

Jeong, M., Park, S., Byun, M. (2001) Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene transfer. *Molecules and cells* 2: 185-189.

Jiang, S.C., Mei, C., Liang, S., Yu, Y.T., Lu, K., Wu, Z., Wang, X.F., Zhang, D.P. (2015) Crucial roles of the pentatricopeptide repeat protein SOAR1 in *Arabidopsis* response to drought, salt and cold stresses. *Plant Molecular Biology*, 88(4-5): 369-385.

John, R., Ahmad, P., Gadgi, K., Sharma, S. (2009) Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by Brassica juncea L. *International Journal of Plant Production*, 3(3): 65-76.

Kappachery, S., Baniekal-hiremath, G., Woong Yu, J., Park, A.W. Effect of over- and under-expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase on tolerance of plants to water-deficit stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(1): 97-107

Karas, M., Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60: 2299-2301.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.J. (2001). Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *The Plant Cell*, 13: 889-905.

Kraljević Pavelić, S., Pavelić, K. (2009) Novo doba molekularne medicine: dometi proteomike. *Medicina*, 45: 208-210.

Krishnaraj, C., Jagan, E.G., Ramachandran, R., Abirami, S.M., Mohan, N., Kalaichelvan, P.T. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47: 651-658.

Kumari, M., Khan, S.S., Pakrashi, S., Muhkerjee, A. Chandrasekaran (2011) Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*, 190: 613-621.

Kotera, E. Tasaka, M., Shikanal, T. (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature*, 433: 326-330.

Krsnik-Rasol, M., Balen, B., Maček, B., Pavoković, D. (2004) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina [online], Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, str. 3-17. <<http://molekularna.biol.pmf.unizg.hr/kolegiji/MIPSKRIPTA2005.pdf>> Pristupljeno 04. kolovoza 2016.

Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Kroll, A., Hahn, D., Schnekenburger J., Wiench K., Wohlleben, W. (2010) Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Advanced Materials*, 22: 1–27.

Lal, S.K., Lee, C., Sachs, M.M. (1998) Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize. *Plant Physiology*, 118: 1285–1293.

Lanje, A.S., Sharma, S.J., Pode, R.B. (2010) Synthesis of silver nanoparticles: a safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2: 478-483.

Levan, A. (1938) The effect of colchicines on root mitoses in *Allium*, *Hereditas*, 24: 471-786.

Liu, J., Rice, J.H., Chen, N., Baum, T.J., Hewezi, T. (2014) Synchronization of developmental processes and defense signaling by growth regulating transcription factors. *PLoS One*, 9(5): e98477.

Lopez, J.L. (2007) Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B*, 849: 190-202.

Luoma, S.N. (2008) Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges. Emerging Technologies Report. Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, D.C.

Lu, C.M., Zhang, C.Y., Wen, J.Q., Wu, G.R., Tao, M.X. (2002) Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Science*, 21: 168-171.

Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L., Small, I. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis". *Plant Cell*. 16(8): 2089–2103.

Ma, H.S., Liang, D., Shuai, P., Xia, X.L., Yin, W.L. (2010) The salt and drought inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 61(14): 4011-4019.

Manna, S. (2015) An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie* 113: 93-99.

Margolis, J., Kenrick, K. (1969) Two-dimensional resolution of plasma proteins by combination of polyacrylamide disc and gradient gel electrophoresis. *Nature*, 221; 1056-1057.

McLaughlin, M.J., Parker, D.R., Clarke, J.M. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Research*, 60: 143-163.

Medzihradszky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L., Burlingame, A.L. (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Analytical chemistry*, 72(3): 552-558.

Mimura, T., Kura-Hotta, M., Tsujimura, T., Ohnishi, M., Miura, M., Okazaki, Y. (2003) Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta* 216(3): 397–402.

Menzes Sobreira, A.C., Maia, Y., Reboucas, D.M., Bezerril Fontenele, N.M., Costa, J.H., Otoch M.O., de Oliveira, L.M., Orellano, E.G. (2014) Vacuolar proton pumps regulation during development of *Vigna unguiculata* seedlings under salt stress. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26(3): 167-175.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, 16: 300-309.

Monica, R.C., Cremonini, R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62: 161-165.

Nam, M.H., Huh, S.M., Kim, K.M., Park, W.J., Seo, J.B., Cho, K., Kim, D.Y., Kim, B.G., Yoon, I.S. (2012) Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. *Proteome Science*, 10: 25.

Nanotechnology Products Database: <http://product.statnano.com/> (25.08.2016.)

Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N. (2003) Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 253-259.

Nowack, B., Bucheli, T.D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 50: 5-22.

Nurani S.J., Saha C.K., Khan A.R, Sunny S.M.H. (2015) Silver nanoparticles synthesis, properties, applications and future perspectives: a short review. *Journal of Electrical and Electronics Engineering*, 10: 117-126.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 250(10): 4007-4021.

Omidbakhshfard, M.A., Proost, S., Fujikura, U., Mueller-Roeber, B. (2015) Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular Plant*, 8(7): 998-1010.

Oukarroum, A., Barhoumi L., Pirastru L., Dewez, D. (2013) Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4): 902-907.

Paulo, J.A., Kadiyala, V., Banks, P.A., Steen, H., Conwell, D.L. (2012) Mass Spectrometry-Based Proteomics for Translational Research: A Technical Overview. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85: 59-73.

Pawlak, S., Decker, J. Histone modifications under environmental stress. *Biological Letters*, 44(2): 65-73.

Peharec Štefanić, P., Koffler, T., Adler, G., Bar-Zvi, D. (2013) Chloroplasts of Salt-Grown Arabidopsis Seedlings Are Impaired in Structure, Genome Copy Number and Transcript Levels. *PLoS One*, 8(12): e82548.

Prabhu, S., Poulouse, E.K. (2012) Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2: 32.

Qin, Y., Zhang, S., Zhang, Lm Zhu, D., Syed, A. (2005) Response of *in vitro* strawberry to silver nitrate (AgNO₃). *Horticultural Science*, 40: 747-751.

Qureshi, M.I., Israr, M., Abdin, M.Z., Iqbal, M. (2005) Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 185-193.

Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17: 208-212.

Riccardi, F., Gazeau, P., de Vienne, D., Zivy, M. (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize . Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology*, 117: 1253-1263.

- Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 3485–3498.
- Rius, S.P., Casati, P., Iglesias, A.A., Gomez-Casati, D.F. (2008) Characterization of Arabidopsis lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiology*, 148: 1655-1667.
- Rogić, T., Horvatić, A., Tkalec, M., Cindrić, M., Balen, B. (2015) Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl mannitol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122: 127-146.
- Romeis, T. (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5): 407-414.
- Rostami, F., Ehsanpour, A.A. (2009) Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* culture. *Malaysian Applied Biology*, 38(2): 46-54.
- Salekdeh, G.H., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B. (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2: 1131–1145.
- Sekhon, B.S. (2014) Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology Science and Applications*, 20: 31-53.
- Sharon, M., Choudhary, A.K., Kumar R. (2010) Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytology*, 2: 83-92.
- Silva, T., Pokhrel, L.R., Dubey, B., Tolaymat, T.M., Maier, K.J., Liu, X. (2014) Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of the Total Environment*, 468: 968-976.
- Sirover, M.A. (2011) On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810: 741–751.
- Skopelitis, D.S., Paranychanakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A.K., Stephanou, E.G., Roubelakis-Angelakis, K.A. (2006) Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell*, 18: 2767–2781.

Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182.

Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., Lee, E.J. (2013) Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93: 60-67.

Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J., Doktycz, M.J. (2010) Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environmental Science & Technology*, 44: 5210–5215.

Sung, D.Y., Vierling, E., Guy, C.L. (2001) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology*, 126: 789-800.

Swindell, W.R., Huebner, M., Weber, A.P. (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8: 125.

Štefan, L., Tepšić, T., Zaviđić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*, 43: 84-93.

Takenaka, M., Verbitskiy, D., Zehrmann, A., Brennicke, A. (2010) Reverse genetic screening identifies five E-class PPR-proteins involved in RNA editing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(35): 27122-27129.

Thiellement, H. Zivy M., Plomion, C. (2002) Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 782: 137–149.

Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R.C., Lead, J.R. (2012) Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology*, 46: 7011–7017.

Tiwari, M., Krishnamurthy, S., Shukla, D., Kiiskila, J., Jain, A., Datta, R., Sharma, N., Sahi, S.V. (2016) Comparative transcriptome and proteome analysis to reveal the biosynthesis of gold nanoparticles in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 6: 21733.

Umeda, M., Hara, C., Matsubayashi, Y., Li, H.H., Liu, Q., Tadokoro, F., Aotsuka, S., Uchimiya, H. (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology*, 25: 469-478.

- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D. (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1161-1208.
- van Ooijen, G., Mayr, G., Kasiem, M.M., Albrecht, M., Cornelissen, B.J., Takken, F.L. (2008) Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *Journal of experimental botany*, 59(6): 1383-1397.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S. (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6: 1769-1780.
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., Bracale, M. (2013) Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLOS ONE* 8:e6875 doi: 10.1371/journal.pone.0068752
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M., Bracale, M. (2014) Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *J Plant Physiol* doi: 10.1016/j.jplph.2014.05.002
- Vinocur, B., Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 123-132.
- Wagner, G.J. (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy*, 51: 173-212.
- Wang, L., Liu, X., Liang, M., Tan, F., Liang, W., Chen, Y., Lin, Y., Huang, L., Jianhong, X., Chen, W. (2014) Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0083141
- Wang, Q.J., Sun, H., Dong, Q.L., Sun, T.Y., Jin, Z.X., Hao, Y.J., Yao, Y.X. (2016) The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. *Plant Biotechnology Journal*, 1-12.
- Warner, J.R., McIntosh, K.B. (2009) How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Molecular Cell*, 34(1): 3-11.
- Whitley, D., Goldberg, S.P., Jordan, W.D. (1999) Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, 29: 748-751.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology*, 14(1): 61-65.

- Wollgiehn, R., Neumann, D. (1999). Metal Stress Response and Tolerance of Cultured Cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: Role of Heat Stress Proteins. *Journal of Plant Physiology*, 154: 547-553.
- Wool, I.G. (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(5): 164-165.
- Yasur, J., Rrani, P.U. (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 8636-8648.
- Yan, S., Tang, Z., Su, W., Sun, W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 5: 235–244.
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, P.B., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J., Bernhardt, E.S. (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology*, 45: 2360-2367.
- Zeng, Y., Tan, X., Zhang, L., Long, H., Wang, B., L, Z., Yuan, Z. (2015) A fructose-1,6-biphosphate aldolase gene from *Camellia oleifera*: molecular characterization and impact on salt stress tolerance. *Molecular Breeding*, 35: 17.
- Zhang, X.H., Rao, X.L., Shi, H.T., Li, R.J., Lu, Y.T. (2011) Overexpression of a cytosolic glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene OsGAPC3 confers salt tolerance in rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 1–11.
- Zhang, H.Y., Jiang, Y.N., He, Z.Y., Ma, M. (2005) Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Plant Physiology*, 162: 977-984.
- Zivy, M., de Vienne, D. (2000) Proteomics; a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*, 44: 575-580.
- Zörb, C., Schmitt, S., Neeb, A., Karl, S., Linder, M., Schubert, S. (2004) The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science*, 167: 91–100.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04. veljače 1991. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Trnsko i II. gimnaziju. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2009. godine. Kroz takav studijski program, stekla sam mnoga teorijska i praktična znanja iz biologije, kemije i metodike nastave tih predmeta. Tijekom studija sam odradila metodičku praksu iz nastave biologije u OŠ Sesevetska Sela i metodičku praksu iz nastave kemije u V. gimnaziji u Zagrebu, a pritom sam se upoznala s načinom rada s učenicima različitih dobnih skupina. 2014. godine sudjelovala sam u organizaciji i realizaciji Noći biologije, manifestacije koja na edukativan, ali zabavan način promiče biologiju i znanost općenito. Od 2015. godine član sam Znanstvenih čarolija, volonterskog projekta Studentske sekcije HKD-a s ciljem popularizacije kemije i znanosti uopće, a unutar kojeg sam održala mnoge radionice s vrtićkom i djecom nižih razreda osnovne škole. U slobodno vrijeme volontirala sam u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.